

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
MÜKOLOOGIA ÕPPETOOL

Kadri Onemar

Tamme seemikute inokuleerimine suvitrühvli (*Tuber aestivum*) eostega

Geenitehnoloogia eriala

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: Leho Tedersoo, PhD

Eveli Otsing, MSc

Tartu 2016

Tamme seemikute inokuleerimine suvitrühvli (*Tuber aestivum*) eostega

Trühvlid on ektomükoriissed seened, mis moodustavad söödavaid maasiseseid viljakehi. Suvitrühvel (*T. aestivum*) on levinuim väärtuslik trühvliliik Euroopas ja kultiveeritavatest trühvliliikidest populaarsuselt teine. Eesti päritolu harilikku tamme (*Q. robur*) nakatati Eesti ja Gotlandi päritolu suvitrühvliga. Nakatatud seemikuid kasvatati erineva koostisega substraatides ja mõõdeti seemikute kolonisatsioonitaset 7 ja 13 kuu möödumisel nakatamisest. Seemikute elumus ja kolonisatsioonitase erinesid oluliselt sõltuvalt kasutatud substraadist. Ka eoste manustamise viis mõjutas oluliselt seemikute kolonisatsiooni, kuid mitte seemikute elumust. Mõõtmiste vahelisel ajal seemikute kolonisatsioonitase suurenes, saavutades 13 kuu möödumisel keskmiseks tasemeks 17%. Kõige efektiivsem eoste manustamise meetodid on suspensioon, millega saadi seemikute keskmiseks kolonisatsioonitasemeks 23%. Substraatidest andsid parimaid tulemusi keramsiidi ja sõelmete lisandiga substraadid, vastavalt 29% ja 25%.

Märksõnad: *Tuber aestivum*, suvitrühvel, *Quercus robur*, harilik tamm, kultiveerimine

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Inoculation of oak seedlings with summer truffle (*Tuber aestivum*) spores

Truffles are ectomycorrhizal fungi that produce edible hypogeous fruit bodies. Summer truffle (*T. aestivum*) is spread throughout Europe and it is the second most cultivated truffle in the world. Estonian common oak (*Q. robur*) seedlings were inoculated with summer truffle fruit bodies originating from Estonia and Gotland and grown in different substrates. The colonisation of the seedlings was measured 7 and 13 months after inoculation. Survival and colonisation intensity differed significantly among the substrate used. Different inoculation methods significantly influenced the colonization of the seedlings but had no effect on their survival. Between measurements, the colonization of the roots increased, reaching a mean value of 17% after 13 months of growth. The most effective inoculation method was spore suspension, which resulted in an average colonization rate of 23%. The best substrates for colonization were substrates with the addition of keramsite granules and screenings of limestone gravel, with the average colonisation rates of 29% and 25%.

Keywords: *Tuber aestivum*, summer truffle, *Quercus robur*, common oak, cultivation

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Trühvlid	6
1.1.1 Trühvlite levik	6
1.1.2 Trühvlite elutsükel.....	7
1.2 Suvitrühvel (<i>Tuber aestivum</i>)	9
1.2.1 Suvitrühvli mõju ümbritsevale keskkonnale	9
1.2.2 Viljakeha	10
1.3 Trühvlite kasvatamine.....	12
1.3.1 Ajalugu	12
1.3.2 Tänapäeval kasutatavad nakatamismeetodid	13
1.3.2.1 Peremeestaime nakatamine eoste suspensiooniga	13
1.3.2.2 Peremeestaime nakatamine mütseeli puhaskultuuriga	14
1.3.2.3 Peremeestaime nakatamine emataime meetodil	14
1.3.3 Seemikute kvaliteedikontroll.....	15
1.3.4 Kolonisatsiooniastme määramise viisid	15
1.4 Istandused	17
1.4.1 Istanduste loomine.....	17
1.4.2 Kasvuks sobiva mulla omadused	19
1.4.3 Liigiga <i>T. aestivum</i> loodud istandused	20
1.4.4 Istanduste hooldamine	20
2. Eksperimentaalosa.....	22
2.1 Töö eesmärgid.....	22
2.2 Materjal ja meetoodika	23
2.2.1 Seemikute kasvatamiseks sobiva substraadi valimine	23
2.2.2 Seemikute nakatamine liigi <i>T. aestivum</i> eostega esimeses katses.....	24
2.2.3 Seemikute ja tõrude nakatamine liigi <i>T. aestivum</i> eostega teises katses	24
2.2.4 Eoste kontsentratsiooni määramine.....	25
2.2.5 Seemikute kasvatamine ja hooldamine	25
2.2.6 Kolonisatsiooni määramine	26
2.2.7 Molekulaarsed meetodid	26
2.2.8 Järjestuste töötlemine	28
2.2.9 Statistiline analüüs.....	28

2.3 Tulemused.....	29
2.4 Arutelu	34
Kokkuvõte	39
Summary.....	40
Tänuavaldused.....	41
Kasutatud kirjandus	42
Kasutatud veebiaadressid	49
Lihtlitsents	50

Sissejuhatus

Trühvlid (*Tuber* spp.) on ektomükoriissed seened, mis moodustavad mutualistliku suhte puitunud varrega õis- ja katteseemnetaimede juurtega (Jeandroz *et al.*, 2008). Sugulisel paljunemisel ehk viljumisel moodustavad trühvlid söödavaid maasiseseid viljakehi. Neist mõnede liikide viljakehad on kulinaarias kõrgelt hinnatud oma suurepärase maitse ja iseloomuliku aroomi tõttu (Weden *et al.*, 2009). Üheks selliseks trühvliliigiks on Euroopas laialdase levikuga suvitrühvel (*Tuber aestivum*).

Trühvlite looduslike kasvukohtade hävimine ja säilinud kasvukohtade tootlikkuse langus, kuid maailma üha suurenev nõue trühvlite järgi, on viinud olukorrani, kus luuakse erinevate söödavate trühvlitega istandusi. Üheks enim kultiveeritud trühvliliigiks on suvitrühvel (Murat, 2015), mida müüakse üle terve maailma. Suvitrühvli populaarsuse suurenemisel maailmas on mitu põhjust: (1) ta on kõige levinum väärtuslik trühvliliik Euroopas, mida on looduslikult leitud veel Põhja-Aafrikast (Jeandroz *et al.*, 2008) ja Hiinast (Song *et al.*, 2005); (2) oma laialdase leviku tõttu kohaneb suvitrühvel paremini erinevate kliimatingimustega ja mulla füüsikaliste ning keemiliste omadustega kui mõned teised hinnatud trühvliliigid, näiteks *Tuber melanosporum* (Hall *et al.*, 2007); (3) seemikute nakatamine liigiga *T. aestivum* on võimalik suhteliselt odava ja lihtsa meetodiga (Iotti *et al.*, 2012); (4) erinevalt liikidest *T. melanosporum* ja *T. magnatum*, on suvitrühvel võimeline kasvama nii küpses metsas kui täiesti avatud kasvukohas (Chevalier & Frochot, 1989).

Kuigi sobiva kliima ja mulla omadustega potentsiaalseid trühvliliikide kasvukohti leidub üle terve maailma, napib trühvlitega nakatunud seemikute kasvatamise kohta infot ja avaldatud soovitusel on üldiselt ebamäärased. Seemikute kasvuks sobiva substraadisegu koostis, nakatamisel kasutatud inokulumi kogus ja kasvatamistingimused erinevad mõnevõrra suuremate seemikute kasvatajate vahel ja trühvlite kõrge hinna tõttu jäävad peamiselt saladuseks (Hall *et al.*, 2003).

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli leida hariliku tamme (*Quercus robur*) seemikute nakatamiseks parimaid tulemusi andev eoste manustamise viis ja seemikute kasvamiseks parim substraat. Kasutades esialgeid tulemusi, kasvatati parima substraadi ja nakatamise meetodiga koloniseeritud seemikuid edasise istanduseksperimenti jaoks.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Trühvlid

Trühvliteks nimetatakse peamiselt kott- (*Ascomycota*) aga ka kandseente (*Basidiomycota*) hõimkonda kuuluvaid seeni, mis moodustavad maasiseseid viljakehi. Trühvlid võib laias laastus jagada kaheks: valetrühvlid ja päristrühvlid. Päristrühvliteks nimetatakse perekonda *Tuber* (*Ascomycota* hõimkond) kuuluvaid ektomükoriisseid seeni. Osa perekonda *Tuber* kuuluvate liikide moodustatud maasisesed viljakehad on söödavad ja kulinaarias kõrgelt hinnatud oma suurepärase maitse ja iseloomuliku aroomi tõttu (Weden *et al.*, 2009).

Trühvlite hulka kuuluvad mõned kõrgelt hinnatud delikatessid, milleks on liigid *Tuber magnatum* Pico. (valge trühvel) ja *Tuber melanosporum* Vittad. (Perigordi trühvel), ja eelnevatest madalama väärtusega trühvlid, milleks on näiteks liigid *Tuber aestivum* Vittad. sünonüüm *Tuber uncinatum* Chad. (suvitrühvel ehk Burgundia trühvel) (Weden *et al.*, 2004a), *Tuber borchii* ja *Tuber macrosporum* Vittad. (Gryndler *et al.*, 2011).

1.1.1 Trühvlite levik

Perekond *Tuber*, kuhu kuulub üle 225 liigi, alamliigi ja varieteedi, on laialdase levikuga. Levikut piiravateks teguriteks on näiteks peremeestaimedele ja seenele sobimatud kasvukohad, ilmastikutingimused ja geograafilised barjäärid (Jeandroz *et al.*, 2008), näiteks kõrged mäed, mered ja ookeanid (Wang *et al.*, 2006). Trühvlid on kohastunud kasvama mõõduka vahemerelise ja mandrilise kliimaga aladel, mistõttu on nad looduslikult levinud enamasti põhjapoolkeral (Jeandroz *et al.*, 2008), eelkõige Euroopas, Põhja-Ameerikas ja Kagu-Aasias (Smith & Read, 2008).

Euroopast on leitud ligikaudu 30 liiki trühvleid (Molinier *et al.*, 2013a). Nendest mõned liigid, nagu *T. aestivum* (Gryndler *et al.*, 2011) ja *T. borchii* (Hall *et al.*, 2007), on erinevatele keskkonnatingimustele (temperatuur, mulla koostis jt) paremini kohastunud ja looduslikult levinud üle terve Euroopa. Teised liigid, mis pole ümbritseva keskkonna tingimuste suhtes nii tolerantset, on piiratud loodusliku levikuga ja leitavad vaid kindlates Euroopa piirkondades. Ümbritsevale keskkonnale tundlikumateks trühvliliikideks on just enim hinnatud delikatessid *T. magnatum*, mida võib leida peamiselt Apenniini poolsaarel (Hall *et al.*, 1998), Horvaatia, Serbia ja Ungari aladel (Marjanovic *et al.*, 2009), ja *T. melanosporum*, mis on looduslikult levinud Lõuna-Euroopas (Itaalia, Prantsusmaa ja Hispaania aladel) (Mello *et al.*, 2006).

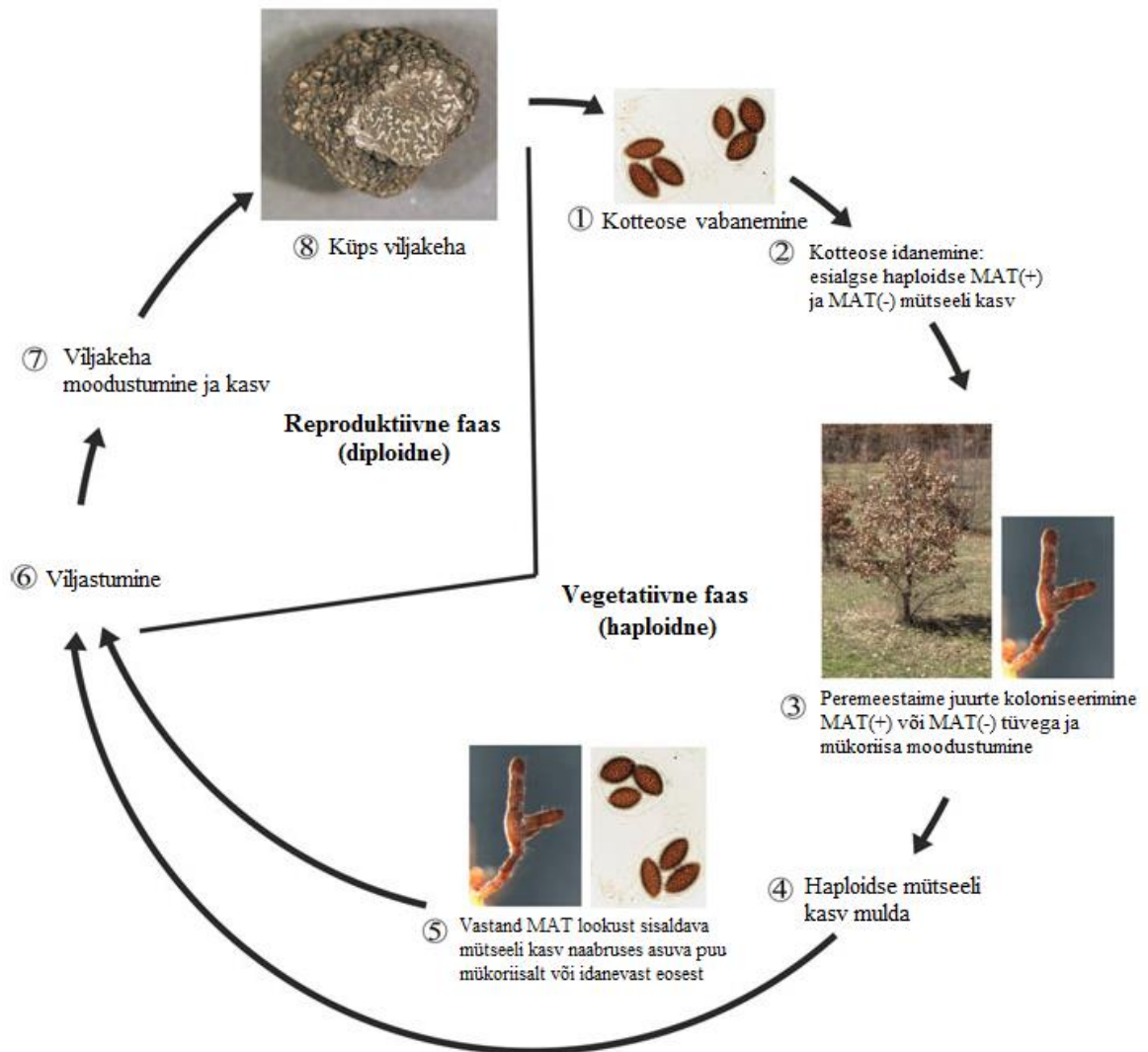
1.1.2 Trühvli elutsükkel

Trühvli elutsükkel on maasisene ja koosneb mitmest erinevast etapist (joonis 1), millest esimeseks on vegetatiivne faas. Vegetatiivses faasis moodustuvad küpsete trühvlieoste idanemisel mullas filamentsed seenehüüfid (Murat *et al.*, 2008a). Sobiva peremeestaime peenjuure ja mütseeli lähestikku asetsemisel koloniseerib esialgne mütseel taimejuure ja moodustub ektomükoriisa ehk seenjuur (Peterson & Bonfarte, 1994), kus seeneniidid levivad peremeestaime juurerakkude vahel nende sisemusse tungimata. Sellise struktuuri moodustumine on kasulik mõlemale osapoolale: seen varustab taime vee ja mineraalainetega ning vastutasuks saab taimelt erinevaid süsinikuühendeid. Lisaks toitainetega varustamisele, soodustavad ektomükoriissed seened peremeestaime kasvu ja suurendavad nende põuataluvust. Ektomükoriisa moodustumise viimase etapina kasvab seenmantlist seenehüüfide võrgustik, mille külge moodustuvad seene hilisema arengu käigus viljakehad (Smith & Read, 2008).

Trühvli mütseel võib moodustada mükoriisa puitunud varrega õis- või katteseemnetaimede juurtega (Jeandroz *et al.*, 2008). Peremeestaime spetsiifilisus varieerub erinevatel trühvliliikidel kindlast liigist (*host specific*) kuni sobiva perekonnani (*host generalist*) (Benucci *et al.*, 2012a). Üldiselt on levinumateks peremeestaimedeks erinevad tamme- (*Quercus*), sarapuu- (*Corylus*), paju- (*Salix*) ja pärnaliigid (*Tilia*) (Hall *et al.*, 2007), kuid osad trühvliliigid, nagu *T. melanosporum*, kasvavad ja moodustavad viljakehi edukalt põhjapoolkeralt pärinevate lehtpuudega, kuid okaspuudega on täheldatud trühvliliigi aeglast kasvu ja viljakehade puudumist (Benucci *et al.*, 2012b).

Kui eosest arenev mütseel on moodustanud mükoriisa sobiva peremeestaime juurtega, võib alata maa-aluste viljakehade areng (Peterson & Bonfarte, 1994) ehk suguline paljunemine, mis tähendab, et trühvlil siiani kestnud haploidne faas asendub diploidse faasiga. Seente suguline paljunemine on reguleeritud genoomi kindla regiooni – MAT lookuse (*mating type locus*) – kaudu (Fraser & Heitman, 2003). Trühvlid on heterotalsed organismid ehk edukaks paljunemiseks peavad ühinema erinevaid MAT geene (MAT(+) ja MAT(-)) kandvad tüved. Kuna iga kotteose idanemisel tekkinud seeneniidistik sisaldab vaid ühte MAT lookuse varianti, tähendab see, et suguliseks paljunemiseks on vaja kahe erinevat lookust kandva seeneniidistiku kokkupuudet. Vastand MAT lookust sisaldav mütseel on tavaliselt pärit naabruses asuva puu mükoriisalt või tekkinud lähedal asuva eose idanemisel (Rubini *et al.*, 2012). Viljakeha valmimisel toimub eoste küpsemine ja moodustub trühvlitele iseloomulik lõhn, mis meelitab

ligi erinevaid metsloomi. Trühvlid levivad looduses eostega, mis läbivad loomade seedekulgl ja satuvad kasvuks sobivatesse paikadesse (Trappe & Claridge, 2010).



Joonis 1. Perekonda *Tuber* kuuluvate trühvlite elutsüklil (võetud artiklist Rubini *et al.*, 2012). Kotteosed vabanevad küpsetest viljakehadest (1). Toimub eose idanemine ja moodustub MAT(+) või MAT(-) lookust kandev haploidne mütseel (2), mis peremeestaime juuri koloniseerides moodustab ektomükoriisa (3). Sobivaltel kliimaatilistel tingimustel areneb mükoriisast mulda seenehüüfide võrgustik (4), mille kokkupuutel vastandtüve omava mütseeliga (5) toimub viljastumine (6). Viljastumise tulemusena tekib viljakeha – trühvel (7), kus küpsemise käigus toimub kaksiktuumalistes hüüfides tuumade ühinemine (karüogamia) ja seejärel meiotiline jagunemine. Küps viljakeha (8) sisaldab haploidseid kotteoseid, mis sobivaltel tingimustel on võimelised idanema.

1.2 Suvitrühvel (*Tuber aestivum*)

Suvitrühvli peetakse üheks hinnatuimaks söögiseeneks maailmas ning tema populaarsus maailma turul üha kasvab. Liiki *T. aestivum* võib nimetada kõige levinumaks väärtuslikuks trühvliliigiks Euroopas (Gryndler *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2007), sest on võimeline kasvama erinevate kliimatingimuste ja mulla omadustega kasvukohtades üle kogu Euroopa. Suvitrühvli looduslikud kasvukohad ulatuvad Rootsist kuni Põhja-Aafrikani (Maroko) ja Hispaaniast Ida-Euroopani (Jeandroz *et al.*, 2008), kuid on leitud ka Hiinast (Song *et al.*, 2005). Kindlasti pole tänaseks veel täpselt teada, kui laialdaselt on suvitrühvel maailmas levinud. Alles hiljuti leiti Eestis esmakordselt looduslikust kasvukohast suvitrühvli viljakehad¹, mistõttu on liigi *T. aestivum* looduslik levila laiem kui varem arvatud.

Laialdase leviku põhjuseks on suvitrühvli suurem kohanemisvõime muutuvate keskkonna tingimustega (Pomarico *et al.*, 2007). Väiksem tundlikkus madalamatele temperatuuridele võimaldab sellel trühvliliigil kasvada ja viljuda põhjapoolsematel aladel kui paljud teised trühvliliigid, näiteks *T. magnatum* ja *T. melanosporum*. Lisaks geograafilisele levikule on suvitrühvlil ka lai ökoloogiline ulatus. Nimelt on ta võimeline kasvama erinevates mullatüüpides, kui on täidetud kindlad kriteeriumid. Näiteks võib liik *T. aestivum* kasvada nii liiv- kui savimuldades (savi sisaldus kuni 60%), kui need mullad on lubjarikkad, hea õhustatuse ja vee läbilaskvusega. Üldiselt sobivad kasvukohtadeks söötis põllud, karjamaad, kuid isegi tammede ja valge pöõgi metsad (Chevalier & Frochot, 1989).

Suvitrühvel on võimeline ektomükoriisat moodustama enam kui 20 erineva puuliigiga (Garcia-Montero *et al.*, 2014), milleks on põhiliselt heitlehelised taimed, näiteks mitmed tammeliigid (*Quercus* spp.), harilik pöök (*Fagus sylvatica* L.) ja harilik sarapuu (*Corylus avellana* L.) (Chevalier & Frochot, 1989). Kuna liigi *T. aestivum* uute kasvukohtade otsimisel keskendutakse enamasti heitlehelise taimestikuga aladele (Stobbe *et al.*, 2013), on vähem teada, et suvitrühvli peremeestaimedeks on ka okaspuud, näiteks mänd (*Pinus nigra* ja *Pinus sylvestris*) (Garcia-Montero *et al.*, 2014), harilik kuusk (*Picea abies*) ja Euroopa nulg (*Abies alba*) (Stobbe *et al.*, 2012).

1.2.1 Suvitrühvli mõju ümbritsevale keskkonnale

Lisaks peremeestaimedele, pole siiani leitud muid indikaatorliike, mis viitaks trühvli mütseeli olemasolule mullas. Samas on täheldatud, et osade trühvliliikide (*T. aestivum*, *T. melanosporum*

¹ Vaata <http://m.postimees.ee/section/380/3336603>

ja *T. indicum*) kasvukohtades ümbritseb peremeestaime vähese taimkattega ringjas ala, mida nimetatakse prantsuse keelest tuleneva terminiga brûlé (Lanza *et al.*, 2004; Plattner & Hall, 1995). Brûlé on põhjustatud trühvlite mütseeli sünteesitud metaboliitide fütotoksilisest toimest (Pomarico *et al.*, 2007). Ümbritsevasse mulda eralduvad keemilised ained tapavad taimsed konkurendid, mille tulemusel taimede biomassist vabanevad mineraalained on mütseeli arenemisel lisatoitaineteks (Gryndler *et al.*, 2013). Taimeliigid, mis vaatamata seene sünteesitud keemiliste ainete fütotoksilisele mõjule brûlé alal kasvavad, on nende ainete suhtes resistentsed (Gryndler *et al.*, 2014). Lisaks mineraalainete vabanemisele, soodustab brûlé teke peremeestaime juurtel mükoriisa moodustumist. Nimelt on suvitrühvel võimeline mulla pH väärtuse tõstmisega tekitama peremeestaimele stressi, mille vastuseks suurendab taime juuretippude arvu, soodustades omakorda mükoriisa moodustumist (Garcia-Montero *et al.*, 2009).

Taimkatte vähenemine peremeestaime ümber on inokuleeritud seemikute istutamise puhul märgatav tavaliselt kahe aasta möödumisel (Streiblova *et al.*, 2012), kuid loomulikult teel nakatunud puude ümber moodustub brûlé aeglasemalt. Liigi *T. aestivum* tekitatud brûlé moodustub enamasti nelja aasta jooksul (Belloli *et al.*, 2001, viidatud artiklis Bruhn *et al.*, 2013), kuid sõltub eelkõige peremeestaime liigist. Mida kiiremini taime kasvab, seda varem on võimalik taimkatte hõrenemist märgata (Streiblova *et al.*, 2012) ja seda kiiremini brûlé tekib. Viimast on oluline teada, sest suuremas brûlé alal moodustub rohkem trühvli viljakehi (García-Montero *et al.*, 2014).

1.2.2 Viljakeha

Suvitrühvli viljakehad on tavaliselt ümmargused ja 2-10 cm läbimõõduga. Viljakeha välimine kiht ehk periid võib varieeruda pruunist mustani ning on kaetud viie- kuni seitsmetahuliste püramiidjate tüügastega. Viljakeha fertiilne osa (gleeba), milles asuvad eoseid sisaldavad eoskotid, on arengu algusfaasis valge, kuid küpsemise käigus muutub pähkelpruuniks (joonis 2). Küpse viljakeha sisemuses vaheldub tumepruun gleeba valgete steriilsete soontega, mis õhuga kokkupuutel säilitab oma värvi. Iga eoskott sisaldab 2-6 kotteost, mis on ellipsikujulised ning küpsemisel muutuvad läbipaistvatest kollakakspruunideks (joonis 3) (Hall *et al.*, 2007; Streiblova *et al.*, 2010).



Joonis 2. Eestist korjatud suvitrühvli viljakehad (foto: E. Otsing). Vasakpoolsel viljakehal on näha viljakeha välimist kihti (periid), mida katavad püramiidjaid tüükad. Parempoolse viljakeha gleeba on küpsenud pähkelpruuniks ja asub vaheldumisi valgete steriilsete soontega. Mõõtjoone pikkus 1 cm.



Joonis 3. Suvitrühvli eosed (foto: K. Onemar). Eoste pind on kaetud meekärje kujulise võrgustikuga ja nähtavad on perekonna *Tuber* eostele iseloomulikud ogad. Eoseid ümbritsev eoskott on värvusetu. Mõõtjoone pikkus 30 µm.

Viljakehade küpsemisperiood erineb Euroopa piires, esinedes lõunamaades suvel ja põhjamaades sügisel (Chevalier & Frochot, 1997, viidatud artiklis Molinier *et al.*, 2013b). Näiteks on Kreekas suvitrühvli küpsemisperiood maist juulini (Diamandis & Perlerou, 2008), kuid Rootsis valmivad viljakehad augustist novembrini (Weden *et al.*, 2004a,b). Samas on näidatud, et Saksamaal mõõduka kliimaga aladel on kaks küpsemisperioodi maksimumi: juuli ja november (Stobbe *et al.*, 2012). Üldiselt võib öelda, et suvitrühvli viljakehad küpsevad soodsatel tingimustel mai lõpust kuni talveni (Chevalier & Frochot, 1997, viidatud artiklis Gryndler *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2007). Ühe trühvliliigi kasvatamine erineva kliimaga

kasvukohtades mõjutab viljakehade moodustumise ja küpsemise aega, mis võimaldab pikendada trühvlite hooaega. Näiteks istanduste loomine Iisraeli võimaldab liigi *T. aestivum* hooaega nihutada varasemaks, sest Euroopaga võrreldes valmivad sealsed viljakehad paar nädalat varem (Turgeman *et al.*, 2012).

Oma laialdase leviku tõttu võib suvitrühvel kasvada aladel, mille kasvutingimused on halvemad viljakehale iseloomuliku lõhna arengul (Weden *et al.*, 2005). Suvitrühvel eelistab kasvamiseks ja viljakehade moodustamiseks varjulisi ja poolvarjulisi ning väldib otsese päikesevalgusega kasvukohti (Chevalier & Frochot, 1997, viidatud artiklis Weden *et al.*, 2005), kuid on võimeline kasvama ka kuivemates ja päikselisemates kohtades. On täheldatud, et maapinnale lähedal asuvad viljakehad küpsevad kuumade ja kuivade suvedega varem, kuid küpsemine toimub mittetäielikult ja ilma iseloomuliku aroomi ja maitse omandamiseta (Weden *et al.*, 2005).

1.3 Trühvlite kasvatamine

1.3.1 Ajalugu

Esimesed katsetused trühvlite kultiveerimiseks algasid juba 18. sajandil, mil suudeti edukalt kasvatada Perigordi trühvli (*T. melanosporum*) uutes kasvukohtades (Hall & Yun, 2002). Meetod, mida tänapäeval kutsutakse Taloni meetodiks (Hall *et al.*, 2003), hõlmab seemikute kasvatamist kindla trühvliliigiga mükoriisa moodustunud peremeestaime ümbruses, kus mullas olev seeneniidistik moodustab mükoriisa ka ümbruses asuvate seemikute juurtega. Hiljem istutatakse trühvli mütseeliga nakatunud seemikud uude kasvukohta (Hall & Yun, 2002). Kuna trühvlite looduslikes kasvukohtades olev muld ei sisalda vaid soovitud trühvli mütseeli, võivad sellise meetodiga nakatunud seemikud olla saastatud konkureerivate ektomükoriisete seente, patogeenide ja putukkahjuritega. Eelnevalt kirjeldatud tehnika ei garanteeri trühvlite tootmist, kuid oli sellegipoolest laialdaselt kasutusel kuni 1970. aastateni (Hall *et al.*, 2003). Kuigi praeguseks on välja töötatud efektiivsemaid meetodeid, kasutatakse Taloni meetodit siiani näiteks Hispaanias (Wang & Hall, 2004).

Alles 1960. aastate lõpus ja 1970. aastate alguses töötati Euroopas välja teisigi meetodeid sobivate peremeestaime nakatamiseks erinevate trühvliliikidega. Uued meetodid võimaldasid peremeestaimi nakatada ja kasvatada kontrollitud tingimustes (Chevalier, 1998), mis suurendas trühvleid tootvate puude arvu ja võimaldas luua istandusi aladele, kus looduslikult neid trühvleid ei kasvanud (Hall & Yun, 2002).

1.3.2 Tänapäeval kasutatavad nakatamise meetodid

Sobiva peremeestaime nakatamine kindla ektomükoriisat moodustava seenega on võimalik mitmel erineval viisil: (1) otsese kontakti tekitamine juurte ja idanevate eoste vahel, (2) kokkupuude juba moodustunud ektomükoriisa või (3) seenemütseeliga (Giovannetti *et al.*, 1994). Sõltuvalt eelnevalt välja toodud viisidest, on tänapäeval kasutatavateks nakatamise meetoditeks vastavalt trühvlieoste suspensiooni, trühvli mütseeli või mükoriisse emataime kasutamine (Zambonelli *et al.*, 2010). Kuigi mõni meetod on teisega võrreldes eelistatum, sõltub nakatamistehnika edukus kultiveeritavast trühvliliigist ja peremeestaimest (Weden *et al.*, 2009). Näiteks pole siiani suudetud peremeestaimi nakatada liigi *T. mangatum* viljakehadest valmistatud eoste suspensiooniga, kuid emataime meetodiga on uute seemikute tootmine võimalik (Giovannetti *et al.*, 1994).

Kõik uuemad nakatamise meetodid vajavad ektomükoriisete juuretippudeta seemikuid, mis saavutatakse steriilsetes tingimustes. Seemikuid kasvatatakse puhtas, soojas ja tehisvalgustusega ruumis kuni nad on võimelised mükoriisat moodustama. Seejärel eemaldatakse seemikud substraadist, pestakse õrnalt puhtaks, vältides peenjuurte kahjustamist, ja kontrollitakse, kas seemikutel puuduvad ektomükoriissed juuretipud (Hall & Wang, 1998). Puhtad ja saastumata seemikud on valmis trühvlitega nakatamiseks või ümberistutamiseks.

1.3.2.1 Peremeestaime nakatamine eoste suspensiooniga

Kõige laialdasemalt kasutusel olevaks meetodiks on idaneva seemne (Gogan Csorbaine *et al.*, 2007) või taime juurte nakatamine trühvlieoste suspensiooniga, kus mükoriisat moodustav seenemütseel on arenenud küpsete eoste idanemisel. Suspensiooniks on homogeenne lahus, mis koosneb veest ja purustatud värsketest, külmutatud või kuivatatud viljakehadest. Kuigi selline meetod on mütseeliga nakatamisega ja emataime meetodiga võrreldes odavam (Parlade *et al.*, 1996), vajab see suhteliselt suurt kogust viljakeha iga katse jaoks. Üldiselt on seemiku nakatamiseks soovitatav kogus 10^5 - 10^7 eost (Weden, 2004; Hall *et al.*, 2007) ehk üks kuni viis grammi värsket viljakeha ühe taime kohta, et saavutada optimaalne kolonisatsioonaste (Dominguez *et al.*, 2005, Palazon & Barriuso, 2007, viidatud artiklis Pereira *et al.*, 2013).

Sellisel meetodil on võimalik kaubanduslikult toota liikidega *T. aestivum*, *T. melanosporum*, *T. borchii*, *T. macrosporum* ja *T. brumale* nakatatud seemikuid (Hall *et al.*, 2007; Iotti *et al.*, 2012). Mükoriisa võib moodustuda noorel seemikul nakatamisest juba 2-3 kuu möödumisel,

kuid optimaalse tulemuse saamiseks peaks taime kasvatama sobivates tingimustes 8-10 kuud (Giovanetti *et al.*, 1994).

1.3.2.2 Peremeestaime nakatamine mütseeli puhaskultuuriga

Selle meetodi puhul kasvatatakse enne seemikute nakatamist sobiva trühviliigi eostest, mükoriisast või viljakeha tükkidest mütseel, mida seejärel kasutatakse uute seemikute nakatamiseks. Kõige sagedamini kasutatakse mütseeli saamiseks väikeseid viljakeha tükke. Seda põhjusel, et üksikuid eoseid on mütseeli kasvatamiseks raske eraldada ja mükoriisa võib sisaldada saastavaid mikroorganisme (Hall & Wang, 1998).

Kuigi mütseeliga nakatamise meetod nõuab täielikku steriilsust ning seda on keerulisem rakendada (Giovannetti *et al.*, 1994), võimaldab see toota konkureerivate mikroorganismide vabu seemikuid ja kasutada mulla, kliima ja peremeestaime jaoks kõige paremini kohastunud geneetilist tüve (Hall *et al.*, 2007). Siiani on võimalik seemikuid mütseeliga nakatada mitme trühviliigi puhul (*T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. borchii*, *T. brumale*, *T. rufum*, *T. macrosporum*, *T. maculatum*), kuid seemikute kaubanduslik tootmine mütseeli meetodiga vajab veel mõningat arendust, sest praeguste meetoditega on mütseeli kasv liiga aeglane, et toota seemikuid sama efektiivselt kui suspensioonimeetodiga (Iotti *et al.*, 2002).

1.3.2.3 Peremeestaime nakatamine emataime meetodil

Mütseeliga nakatamise meetodile on alternatiiviks nn emataime meetod, kus uute taimede nakatamiseks kasutatakse juba olemasolevat sobiva kolonisatsioonistmega taime ehk emataime. Kui emataim on saavutanud piisava kolonisatsioonitaseme, istutatakse ta suurde steriliseeritud substraadiga anumasse, mis võimaldab ulatuslikku seeneniidistiku arengut substraadis (Pereira *et al.*, 2013). Ümber emataime istutatakse umbes 10-30 (Hall & Wang, 1998) steriilsetes tingimustes kasvatatud seemikut, mille juured puutuvad kokku substraadis asuva seeneniitide võrgustikuga, moodustades ühise mükoriisa võrgustiku (Pereira *et al.*, 2013).

Emataime meetod võimaldab säästlikumalt kasutada küpseid viljakehi uute seemikute nakatamiseks niikaua, kuni on täidetud steriilsed tingimused ja substraat sisaldab seeneniitide võrgustikku. Võrreldes suspensioonimeetodiga, kiireneb uutel seemikutel mükoriisa moodustumine, sest antud meetodi puhul puudub eoste idanemisele ja algse mütseeli arenguks kuluv aeg (Pereira *et al.*, 2013). Nii mütseeli kui emataimega meetodi puhul on oluline, et uute

seemikute nakatamisel oleks kasutusel mõlemad MAT lookuse tüübid ning puuduksid teised ektomükoriissed seened (Zambonelli *et al.*, 2010).

1.3.3 Seemikute kvaliteedikontroll

Trühvlite edukal kasvatamisel on üheks eelduseks hästi koloniseeritud seemikute kasutamine istanduste loomisel. Turul müügil olevad seemikud võivad olla saastunud soovimatute trühvliliikide, teiste konkureerivate seentega või halvimal juhul ei sisalda üldse soovitud trühvliliigi mükoriisat (Hall *et al.*, 2007). Seetõttu on enne kasvukohta ümberistutamist oluline kontrollida, kas seemikute tootmiseks kasutatud nakatamise meetod ja kasvutingimused on olnud piisavalt efektiivsed. Seda hinnatakse ektomükoriisete seente poolt koloniseeritud peenjuurte osakaaluga. Et kasvukohas oleks sekundaarse nakatumise ja viljakehade moodustumise tõenäosus võimalikult suur, on soovitatav enne ümberistutamist saavutada kõrge kolonisatsioonitase. Seemiku kõrge kolonisatsioonitase vähendab samuti soovitud seene asendumist konkureerivate seentega. Soovitatav minimaalne kolonisatsioonitase sõltub eelkõige kasvukoha kliimast ja mulla omadustest, mis mõjutavad seene konkurentsivõimet ja leviku ulatust. Kuigi üldiselt peetakse piisavaks, kui mükoriisa on moodustunud 30% peenjuurtel, on siiski soovitatud nakatumisprotsent sellest mõnevõrra suurem, sest siis on seene püsijäämise tõenäosus suurem (Iotti *et al.*, 2012). Samas on suvitrühvli puhul näidatud, et 30% kolonisatsioonitasega seemikute istutamisel sobivate omadustega mulda võib kolonisatsioonimäär viie aastaga tõusta 50-70 protsendini (Zambonelli *et al.*, 2005).

Trühvlitega nakatunud seemikuid toodetakse partiidena, millel on sama päritolu, külvamisaeg ja nakatamiseks kasutatud inokulum ning ühesugused kasvutingimused (Palazon *et al.*, 1999, viidatud artiklis Andrés-Alpuente *et al.*, 2014), mistõttu on kvaliteedikontrolliks soovitatav kasutada igast partiist juhuslikult valitud kindel arv seemikuid. Lisaks eelnevalt mainitud kõrgele kolonisatsioonimääradele, ei tohi kontrolliks võetud seemikute peenjuured olla koloniseeritud ühegi teise liigiga perekonnast *Tuber* ja konkureerivad seened ei tohi ületada kindlat osakaalu, milleks enamasti on 20-25% peenjuurtest (Andrés-Alpuente *et al.*, 2014).

1.3.4 Kolonisatsioonitase määramise viisid

Tänapäeval puudub ühtne meetod seemikute kvaliteedi mõõtmiseks, mistõttu on Euroopas laiemalt kasutusel viis üksteisest mõnevõrra erinevat meetodit. Nendest meetoditest neli määrab nakatunud juuretippude osakaalu kogu juuresüsteemist ja vaid üks kasutab selleks eraldatud

juuresüsteemi osa. Mitme meetodi samaaegne kasutamine vähendab teatud mõttes seemikule määratud kolonisatsiooni usaldusväärsust, sest ühe meetodiga kolonisatsiooni määrares võib kolonisatsiooniaste osutuda mitesobivaks, kuid teist meetodit kasutades hinnatakse seemik ümberistutamiseks sobivaks. Selline ebakõla tekib just keskmise kolonisatsiooniastme puhul, mistõttu on probleem sagedane, sest keskmise kolonisatsiooniastmega seemikuid esineb rohkem kui väga madalate või kõrgete kolonisatsiooniastmetega seemikuid (Andrés-Alpuente *et al.*, 2014).

Vanim ja laialdaselt kasutusel olevaks mükoriisa kolonisatsiooni määramise viisiks on Chevalier ja Grente (1979) meetod, mis võimaldab vaid mõne minutiga visuaalselt hinnata trühvliigi ja konkureerivate seente poolt moodustatud mükoriisete juuretippude osakaalu juuresüsteemis (Chevalier & Grente, 1979, viidatud artiklites Andrés-Alpuente *et al.*, 2014 ja Murat, 2015). Teised meetodid määravad seemiku kolonisatsiooniastme, põhinedes juuretippude lugemisel, mistõttu on nad esimesest meetodist aeganõudvamad. Lisaks eeldavad osad meetodid juuresüsteemi teatavat homogeensust, mistõttu ei pruugi määratud kolonisatsiooniaste vastata seemiku tegelikule kolonisatsioonile (Andrés-Alpuente *et al.*, 2014).

Kuigi Chevalier ja Grente (1979) meetodit peetakse subjektiivseks, sest määratud kolonisatsiooniaste sõltub vaatleja kogemusest ja muid kvantitatiivseid andmeid juuresüsteemi vaatlusel ei koguta (Andrés-Alpuente *et al.*, 2014), teostatakse kvaliteedikontroll traditsiooniliselt visuaalselt, kasutades seemiku juuresüsteemi vaatlemiseks stereo- või valgusmikroskoopi (Murat, 2015). Seda põhjusel, et visuaalse vaatlemise ja juuretippude lugemise meetoditega saadud tulemustel pole statistilist erinevust leitud (Benucci *et al.*, 2012b) ja visuaalne meetod on teistega võrreldes kiirem (Andrés-Alpuente *et al.*, 2014).

Lisaks kolonisatsiooniastme määramisele on soovitatav teostada mükoriisete juuretippude molekulaarsed analüüsid, et kinnitada visuaalselt määratud trühvliik, välistada nakatatud liigiga morfoloogiliselt sarnased trühvliigid (Andrés-Alpuente *et al.*, 2014) ja hoida soovimatute liikide sattumist looduslikku keskkonda (Murat, 2015). Selliseks morfoloogiliselt sarnasteks trühvliikideks on näiteks liigil *T. melanosporum* trühvliigid *T. brumale* ja Aasia päritolu *T. indicum* (Murat *et al.*, 2008b; Murat, 2015) ja liigil *T. aestivum* liik *T. sinoaestivum* (Zambonelli *et al.*, 2012). Mõlemal juhul on sarnased liigid vähem väärtuslikud ja võivad looduslikku kasvukeskkonda sattudes käituda sissetungiva liigina, vähendades väärtuslikemate liikide looduslikku levikut ja ohustades nende populatsiooni (Murat, 2015).

1.4 Istandused

Metsaraie, põud, õhu saastatus ning metsa koosluse muutused on vaid mõned põhjused, miks on söödavate ektomükoriisete seente tootlikkus viimase sajandi jooksul langenud (Wang *et al.*, 1997). Näiteks on looduslike kasvukohtade hävimise tõttu langenud liigi *T. melanosporum* tootlikkus ainuüksi Prantsusmaal ühe sajandi jooksul 2000 tonnist 150 tonnini. Järsu languse leevendamiseks hakati 20. sajandi teisel poolel arendama meetodeid, mis võimaldaks uute istanduste loomist (Hall *et al.*, 2003). Uute meetodite rakendamine on teinud võimalikuks luua mitmete söödavate trühvliliikide (*T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. borchii*) istandusi ka aladele, kus need trühvlid loodulikult ei esine (Bonet *et al.*, 2009), näiteks Uus-Meremaa ja Põhja-Ameerika (Hall & Yun, 2002). 2003. aasta seisuga tootsid trühvliistandused umbes poole terves maailmas korjatud trühvlitest (Hall *et al.*, 2003), kuid tänaseks on ilmselt trühvliistandustest korjatud trühvlite osakaal suurenenud.

1.4.1 Istanduste loomine

Iga aastaselt toodetakse istanduste loomiseks maailmas hinnanguliselt 600 000 erinevate trühvliliikidega nakatunud seemikut, millest ainuüksi 500 000 kasvatatakse Euroopas ja 100 000 teistel kontinentidel. Trühvliistandusi luuakse maailmas põhiliselt liikide *T. melanosporum* ja *T. aestivum* nakatatud seemikutega (Murat, 2015). Produktiivse istanduse loomisel on üheks peamiseks eelduseks kvaliteetsete ja kõrge kolonisatsiooniastmega seemikute kasutamine, kuid vaid selle tingimuse täitmine ei taga viljakehade moodustumist. Eduka istanduse jaoks peab olema välja valitud kasvukohas nii trühvliliigile kui peremeestaimele sobiv kliima, mulla omadused ja tekstuur (Hall *et al.*, 2007).

Trühvlite kasvatamisel on esimeseks oluliseks sammuks trühvliliigile ja peremeestaimele sobiva kliimaga kasvukoha valimine, sest isegi väga kõrge kolonisatsiooniastmega seemikute istutamisel ebasobiva kliimaga kasvukohta tõrjuvad kliimale paremini kohastunud kohalikud seened trühvliliigi välja. Sobiva kliimaga kasvukoha leidmisel on järgmiseks sammuks kasvukoha mulla omaduste ja tekstuuri määramine, mis on oluline just sellistel aladel, kus varasemalt pole kultiveeritavat trühvliliiki kirjeldatud. Mulla keemiliste omaduste analüüs näitab, kas muld on trühvliliigi ja peremeestaime kombinatsiooni jaoks õigete keemiliste omadustega ja kas sobimatuid omadusi saab trühvliliigi looduslikele kasvukohtadele sarnaseks muuta. Kuna kõiki mulla omadusi trühvliliikidele sobivaks muuta on raske kui mitte võimatu, on istanduse loomiseks soovitatud valida trühvliliigi looduslikele kasvukohtadele võimalikult sarnane maa-ala (Hall *et al.*, 2007).

Tihti on teiste mulla omaduste poolest sobivad kasvukohad trühvliite kasvatamiseks liiga happelised, mistõttu on vajalik tõsta mulla pH väärtust lupjamisega. Et vähendada mulla hapestumist orgaanilise aine lagunemisega, on eelnevalt soovitatud eemaldada välja valitud maa-ala taimkate. Lupjamisel kasutatav vajalik kogus sõltub istutusala suuruselt, mullakihi paksusest ja tõstetava pH väärtusest. Iga 0,1 ühiku tõstmiseks 10 cm paksuses mullas kulub lupja 1-1,5 t/ha. Et säilitada trühvliiliigi kasvuks sobiv pH väärtus, on soovitatud lupjamist korrata iga kümne aasta jooksul üks kuni kaks korda, sest aja jooksul liigub kaltsium mulla alumistesse kihtidesse. Kuna kõrge pH väärtus muudab mikroelemendid (B, Cu, Fe, Mn ja Zn) taimele raskesti kättesaadavaks, põhjustades näiteks harilikul tammel (*Q. robur*) klorofüllivaegust (kloroosi) ja aeglast kasvu, siis pole soovitatav pH väärtust tõsta üle 8 (Hall *et al.*, 2007).

Istanduse loomisel peetakse kõige suuremaks ohuks konkureerivate ektomükoriisete seente mõju kultiveeritavale trühvliiliigile. Probleemiks on just sellised konkureerivad seened, mis on võimelised kasvama kõrge pH väärtusega mullas ja samas moodustavad ektomükoriisa peremeestaime juurtega. Seepärast soovitatakse istanduse loomiseks valida eelkõige maa-alad, kus domineerib arbuskulaarnse mükoriisa ning ektomükoriisat moodustavaid taimi ei kasva. Kui istandus luuakse metsa asemele, on eeltöödega soovitatud alustada mitu aastat enne planeeritud istutamist. Selle aja jooksul eemaldatakse puud ja nende juuresüsteem. Lisaks on peale puude eemaldamist soovituslik paar aastat kasvatada arbuskulaarset mükoriisat moodustavaid taimi (Hall *et al.*, 2007).

Enamasti on soovitatud seemikute istutusaeg Euroopas hilissügisel (oktoobrist novembrini), kuid teise variandina võib istutada kevadel (veebruari lõpust aprilli alguseni) (Hall *et al.*, 2007). Ideaalseks seemikute vanuseks peetakse umbes kahe-aastaseid seemikuid, et nad oleksid võimelised trühvli eelistatud kasvutingimustes ellu jääma. Seemikud on soovitatud istutada ridadena, suunaga põhjast lõunasse, et päike külmadel talveperioodidel seemikuid ümbritsevat mulda soojendaks (Chevalier & Sourzat, 2012). Seemikute istutuskaugetes reas ja ridade vahelised kaugused varieeruvad, sõltuvalt kultiveeritavast trühvliiliigist ja kasutatud peremeestaimedest. Näiteks on liigi *T. melanosporum* puhul soovitatud istutustihedus 400-800 seemikut/ha, kuid liigi *T. aestivum* puhul tihedam ehk 1250 seemikut/ha (Hall *et al.*, 2007), sest suvitrühvli eelistab varjulisi või poolvarjulisi kasvukohti (Chevalier & Frochot, 1989). Ridade vaheline ala võiks olla piisav, et masinatega oleks võimalik istandust hooldada. Samuti sõltub istutatud seemikute kaugus üksteisest sellest, millal soovitakse umbkaudselt korjata esimene saak, sest tihedamalt istutatud seemikud (üle 500 taime ha kohta) põhjustavad üldiselt varasema trühvliite viljakehade valmimise (Hall *et al.*, 2007).

Esimesed viljakehad ilmnevad tavaliselt 5-10 aastat pärast istutamist (Hall *et al.*, 2007), kuid soodsate tingimuste ja õigete istanduse hooldusvõtetega võivad esimesed viljakehad tekkida juba 3-4 aastat pärast istutamist (Streiblova *et al.*, 2010).

1.4.2 Kasvuks sobiva mulla omadused

Liik *T. aestivum* on võimeline kasvama ja viljakehi moodustama nii kergetes, keskmistes kui ka rasketes muldades niikaua kuni kasvuks kõige olulisemad tingimused – hea mulla õhustatus ja veeringlus – on tagatud. Üldiselt on liigi *T. aestivum* looduslikes kasvukohtades rasked mullad, sisaldades kuni 52,8% savi. Sellised mullad on enamasti leitavad näiteks Prantsusmaal asuvates suvitrühvli looduslikes kasvukohtades, kuid näiteks Rootsis leiduvate looduslike kasvukohtade mullad on pigem kerged, sisaldades vaid 10,4-32,6% savi (Chevalier & Sourzat, 2012).

Trühvlite kasvatamisel on määravaks teguriks mulla füüsikalise-keemilised omadused. Isegi piisava kolonisatsioonitasemega seemiku ümberistutamisel soodsa kliimaga kasvukohta ei toimu viljakeha moodustumine, kui mulla omadused pole trühvliliigi jaoks sobivad. Istanduse loomisel on sobiva kasvukoha leidmiseks oluline analüüsida trühvli kasvu mõjutavaid mulla keemilisi ja füüsikalisi omadusi. Analüüsitavateks keemilisteks omadusteks on pH, kogu lubjakivi kogus, vaba kaltsiumi, orgaanilise aine ja fosfori sisaldus ning süsiniku/lämmastiku (C/N) suhe. Füüsiliste omadustena on määravaks teguriks mulla koostis, vee läbilaskvus ja õhustatus (Chevalier & Sourzat, 2012).

Suvitrühvli looduslikes kasvukohtades varieerub mulla pH väärtus, olles tavaliselt vahemikus 6,6-8,4 (Chevalier & Sourzat, 2012), kuid suvitrühvli viljakehi on leitud ka äärmusliku pH väärtustega (pH=5,9 ja pH=9,4) kasvukohtadest (Gogan Csorbaine *et al.*, 2012). Suvitrühvel eelistab madala fosfori (0,002-0,080%) ja lämmastiku sisaldusega muldasid (Weden, 2004), sest kõrge lämmastiku sisaldus võib mükoriisat kahjustada (Wallander, 1992). Lubjakivi kogus suvitrühvli looduslikes kasvukohtades varieerub suuresti (0,4-52%). Sarnaselt lubjakivi kogusele varieerub suvitrühvli kasvukohtades oluliselt ka orgaanilise aine (0,7-23,52%) ja aktiivse karbonaadi (0-71,43%) sisaldus (Gogan Csorbaine *et al.*, 2012) ja C/N suhe (6,3-20,4) (Pruett, 2008). Eelnevatest vähem varieerub liikuva kaltsiumi hulk mullas (2,8-7,9%) (Chevalier & Sourzat, 2012).

1.4.3 Liigiga *T. aestivum* loodud istandused

Suvitrühvli kultiveerimine muutub mitte ainult Euroopas vaid kogu maailmas iga aastaga üha populaarsemaks, mistõttu on viimastel aastakümnetel levinud selle trühvliliigi kasvatamine ka väljapoole traditsioonilistest trühvleid kasvatavatest Lõuna-Euroopa maadest (Hall *et al.*, 2007). Esimesed liigi *T. aestivum* viljakehad korjati istandusest 1970. aastatel (Chevalier & Grente, 1979, viidatud artiklis Salerni *et al.*, 2014) ja alates sellest ajast on suvitrühvliga nakatatud seemikutega loodud istanduste arv aja jooksul kasvanud. Tänapäevaks on tootlikke suvitrühvli istandusi loodud mitmetes riikides, näiteks Soome (Shamekh *et al.*, 2014), Rootsi (Weden *et al.*, 2009), Iisrael (Turgeman *et al.*, 2012), Kanada (Berch & Bonito, 2014) ja Uus-Meremaa (Hall & Yun, 2002). Eelnevalt nimetatud riikide põhjal on näha, et suvitrühvli kasvatamine on levinud ka aladele, kus suvitrühvli pole varasemalt kirjeldatud.

Istandustes on peremeestaimedena enamasti kasutatud harilikku sarapuud (*C. avellana*) ja erinevaid tammeliike (Weden *et al.*, 2009). Samas on näidatud ka okaspuude sobivust efektiivse peremeestaimena. Umbes 20 aasta vanuses Kesk-Itaalia istanduses avastati, et musta männiga (*Pinus nigra*) istanduse ala andis umbes kaks korda rohkem suvitrühvli viljakehi kui sama puude arvu ja suurusega tamme ala (*Q. pubescens*) (Salerni *et al.*, 2014). Okaspuude suuremat produktiivsust tamme suhtes on märgatud veelgi. Selgub, et männid (*Pinus nigra* ja *Pinus sylvestris*) on suvitrühvli tekitatud stressile altimad kui tammed (*Q. faginea* ja *Q. ilex*), mistõttu toodab sama pindalaga männi brülé kuni kaks korda rohkem suvitrühvli viljakehi kui tamme brülé (Garcia-Montero *et al.*, 2014).

Eestis loodavate istanduste rajamisel ja hooldamisel saab eeskuju võtta Soomes ja Rootsis loodud istandustest ja nende hooldamisest. Kuigi Soome pikad ja külmad talved pole suvitrühvlite kasvuks kõige sobivamad, suudeti peremeestaimi ja suvitrühvli mükoriisat liigse külma eest kaitsta (Shamekh *et al.*, 2009). Isegi pikkade ja külmade talvedega asukohas nagu Soome, on võimalik suvitrühvleid kasvatada².

1.4.4 Istanduste hooldamine

Peamiseks istanduste hooldamise eesmärgiks on mulla pH väärtuse, niiskuse ja temperatuuri säilitamine trühvliliigile sobivas tingimuses, kuid viisid selle saavutamiseks erinevad loodud istanduse asukohast, olemasolevatest võimalusest, ajast ja rahast. Tavaliselt kuulub hooldamise

² Vaata http://chem.aalto.fi/en/current/current_archive/news/2012-10-24/

alla istutatud puude kastmine, puude ümber kasvava taimkatte eemaldamine, mulla õhutamine, puude kärpimine ja neid ümbritseval maa-alal multši kasutamine³.

Multšimine tähendab taimi ümbritseva maa-ala katmist sünteetilise või loodusliku (puukoor, õled, lehed, oksad) vett läbilaskva materjaliga, eesmärgiga suruda maha seemiku ümber tekkivad taimkatet, säilitada mulla niiskust ja temperatuuri (Pruett *et al.*, 2008a). Multšimiseks kasutatud materjalid mõjutavad mulla temperatuuri ja seeläbi ka mulla niiskust erinevalt, näiteks õlgede kasutamisel langeb mulla keskmine temperatuur, mistõttu on muld niiskem, kuid liigne niiskus võib soodustada konkureerivate seente kasvu (Zambonelli *et al.*, 2005).

Loodud istandusi on võimalik hooldada ka ekstreemselt, mis tähendab intensiivset hooldust Pallier'i meetodiga või vähest hooldust Tanguy meetodiga. Tanguy meetodi puhul niidetakse rohtu vaid istutatud puude ümbruses³, kuid esimesel aastal on soovitatud taimi vajadusel ka kasta (Pruett *et al.*, 2008a). Pallier'i meetod on seevastu intensiivne ja sisaldab endas mulla äestamist kevadel ja varasuvel, et vähendada kasvavat rohtu ja õhutada mulda. Taimi kärbitakse, et võimaldada maksimaalne päikese valgus mulla pinnale, sobiva mulla temperatuuri tekkimiseks. Eelnevatele hooldustele lisandub veel kastmine. Mitmete hooldustööde tõttu on Pallier'i meetodil suurem tõenäosus luua trühvli jaoks ebasobivaid kasvutingimusi. Mulla õhutamisel on ohuks juurte kahjustamine, liigse kastmise tõttu võivad eelise saada konkureerivad seemed. Intensiivne hooldus on palju kulukam, kuid trühvliliigile soodsate tingimuste hoidmisel annab häid tulemusi ja on viljakehade edukaks moodustamiseks vajalik.³

³ Vaata <http://www.truffletree.com/plantation/>

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgid olid:

- 1) leida liigiga *Tuber aestivum* nakatatud hariliku tamme (*Quercus robur*) seemikute kasvatamiseks sobivaim substraat;
- 2) leida seemiku nakatamiseks parim trühvli eoste manustamise viis;
- 3) kasvatada parima substraadi ja nakatamise meetodiga koloniseeritud seemikud edasise istanduseksperimenti tarvis.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Seemikute kasvatamiseks sobiva substraadi valimine

Sobiva substraadi leidmiseks segati kokku peamiselt kahest komponendist (turvas ja liiv) koosnevad substraadid. Katses kasutatud substraadid steriliseeriti autoklaaviga, et vähendada konkureerivate ektomükoriisat moodustavate seente mõju soovitud trühvliiliigi koloniseerimisel (Weden, 2004). Lisaks on näidatud, et steriilse substraadi kasutamine trühvlieostega nakatatud seemikute kasvatamisel soodustab taime kasvu ja suurendab kolonisatsioonimäära (Mamoun & Oliver, 1997).

On teada, et mulla pH väärtusel on erinevate trühvliiliikide mükoriisa moodustumisel oluline mõju. Seetõttu mõõdeti steriilsete substraatide pH vesilahuses, et leida liigi *T. aestivum* kasvuks sobivad substraadid. Liigi *T. aestivum* looduslikes kasvukohtades varieerub mulla pH väärtus enamasti vahemikus 6,6-8,4 (Chevalier & Sourzat, 2012), kuhu jääb ka Eestist leitud kasvukoha pH väärtus (7,08). pH väärtuste põhjal valiti esimeseks katseks seitse erineva lisandiga substraati. Katses kasutatud substraatide koostis koos neile vastava pH väärtusega on välja toodud tabelis 1.

Teise katse raames kasutati substraadi valimiseks esimese katse esialgseid tulemusi. Substraadiks valiti seemikute nakatamisest 7 kuu möödumisel parimate tulemustega substraat (1L1T0.2C), mille pH väärtus pärast autoklaavimist oli 7,24.

Tabel 1. Katses kasutatud substraatide koostis ja neile vastav autoklaavitud substraadi pH. L - liiv; T - turvas; S - puusüsi; K - keramsiit; C - lubjakivijahu; A - puutuhk; Sõ - Sõelmed.

Substraat	pH
1L1T	6.97
1L1T0.2S	7.07
1L1T0.5K	7.24
1L1T0.2C	7.25
1L1T0.1A	9.59
1L1T0.5Sõ	8.08
2L2T0.1A0.2K0.1S 0.2C0.2Sõ	8.79

2.2.2 Seemikute nakatamine liigi *T. aestivum* eostega esimeses katses

Peremeestaimena kasutati Luunja pargist korjatud hariliku tamme (*Quercus robur*) seemikuid, mis nakatati liigiga *T. aestivum*. Harilik tamm on suvitrühvli üks peamine peremeestaim Euroopas (Pruett *et al.*, 2008b) ning on kohastunud kasvama Eesti kliimas. Nakatamiseks kasutatud seemikud kasvatati eelnevalt pestud tammetõrudest turbamullas.

Esimese katse puhul manustati eoseid nelja kuu vanuste tamme seemikute juurtele neljal erineval viisil: (1) peenestatud küpse viljakeha ja destilleeritud vee homogeenne lahus ehk suspensioon; (2) agarosgeeli töötlus ja trühvlipulbri kandmine ühtlaselt lühijuurtele; (3) alginaatgeeli töötlus ja trühvlipulbri kandmine ühtlaselt lühijuurtele ning (4) viljakeha suspensioonis immutatud keramsiidi graanulid. Iga töötlust korraldati ühe substraadiga üheksa korda.

Suspensiooni valmistamiseks purustati iga seemiku jaoks 1 g külmutatud suvitrühvli viljakeha käsitsi uhmriga, lisades homogeense suspensiooni moodustumiseni erinevas mahus destilleeritud vett. Nii agaros- kui alginaatgeeli töötlusel kasteti seemiku juured esmalt veidi jahtunud geeli sisse ja seejärel puistati juurtele ühtlaselt 0,5 g trühvlipulbrit. Seemikute nakatamiseks keramsiidi graanulitega valmistati iga seemiku jaoks suspensioon 1 g külmutatud viljakehast, milles immutati 3 g keramsiidi graanuleid. Graanulite-suspensioonisegu valati istutuspotis olevatele juurtele. Liigi *T. aestivum* eoste manustamisel kasutatud trühvlipulbri ja viljakeha kogus ja eoste kontsentratsioon ühe seemiku kohta on välja toodud tabelis 2.

2.2.3 Seemikute ja tõrude nakatamine liigi *T. aestivum* eostega teises katses

Teises katses kasutati peremeestaimena Tartus Tähtvere pargist, Lunini ja Raja tänavalt korjatud hariliku tamme (*Q. robur*) ja Eesti Rahva Muuseum hoovist korjatud punase tamme (*Q. rubra*) tõrusid ja ühe aasta vanuseid hariliku tamme seemikuid. Nakatamisel kasutatud tõrud pesti voolava vee all, et vähendada võimalikke konkureerivaid seeni. Seemikute ja tõrude nakatamiseks valmistati värsketest ja külmutatud viljakehadest suspensioon, mille käigus peenestati viljakehad uhmris käsitsi, lisades homogeense suspensiooni jaoks iga 0,5 g viljakeha kohta 3 ml destilleeritud vett. Tõrude nakatamiseks kanti iga tõru peale ja ümber 3 ml suspensiooni. Aastaste seemikute nakatamiseks kasteti seemiku juuri 3 ml eoste suspensioonis, mis seejärel lisati sama seemiku juurtele istutuskasti. Nakatamiseks kasutatud viljakehade kogus, päritolu ja eoste kontsentratsioon on välja toodud tabelis 2.

2.2.4 Eoste kontsentratsiooni määramine

Nakatamisel kasutatud suvitruhvi külmutatud ja värsketest viljakehadest valmistatud suspensioonist mõõdeti ühe seemiku või tõru nakatamiseks kasutatud eoste kontsentratsioon. Eoste kontsentratsiooni määراتi rakulugemiskambri ehk hematsütomeetriga, kasutades Neubaueri lugemiskambrit. Kontsentratsiooni arvutamiseks loeti eoste kogus igas 1mm² suuruses ruudus (kokku 9 ruutu), seejärel arvutati keskmine eoste arv ühe ruudu kohta ja arvestades tehtud lahjendusi, arvutati ühe seemiku jaoks kasutatud eoste kontsentratsioon. Saadud tulemused on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Seemikute nakatamisel kasutatud eoste kogus ühe seemiku/tõru kohta.

Katse	Eoste algmaterjal	Päritolumaa	Algmaterjali kogus (g)	Eoste sisaldus
1	Trühvipulber	Gotland, Rootsi	0.5 g	4,23x10 ⁶
1	Külmutatud viljakeha	Gotland, Rootsi	1 g	1,37x10 ⁷
2	Värske viljakeha	Eesti	0.5 g	7,5x10 ⁵
2	Külmutatud viljakeha	Eesti	0,5 g	2,45x10 ⁶
2	Külmutatud viljakeha	Gotland, Rootsi	0,5 g	1,91x10 ⁶

2.2.5 Seemikute kasvatamine ja hooldamine

Seemikud kasvatati 45-augulistes istutuskassetides, kus ühe augu mahuks oli 265 cm³. Esimese katse raames nakatati suvitruhvi eostega 288 seemikut, mis pandi kasvama kasvukappi kindlatele tingimustele (temperatuuril 24 °C ja 16 h valgustsüklil). Teise katse raames nakatati suvitruhvi eostega 47 ühe aasta vanust seemikut ja 260 tammetõru, millest 65 olid punase tamme (*Q.rubra*) ja 195 hariliku tamme (*Q.robur*) tõrud. Nakatatud seemikutest 27 ja tõrudest 45 jäeti kasvama toa temperatuurile (keskmiselt 20-21 °C) ja ülejäänud seemikud (20) ja tõrud (225) pandi kasvama kasvukappi esimese katse seemikutega samadele tingimustele. Lisaks kasutati toatemperatuuril kasvanud 17 seemiku ja 20 tõru substraadis autoklaavitud ja purustatud hariliku tamme lehti (1 g seemiku kohta), et uurida, kas orgaanilise aine lisamine mõjutab kolonisatsioonitaset. Seemikuid kasteti kraaniveega ülepäeva, et substraat oleks niiske, kuid ei sisaldaks liigset vett.

Mõlema katse seemikutel esines jahukaste, mis tekkis valgete laikudena ja levis üle lehe. Tamme-jahukaste on kottseente hõimkonda kuuluva seene (*Microsphaera alphitoides*) tekitatud haigus, mis esineb valge pulbrina ja koosneb seene mütseelist ja koniididest. Jahukaste piirab päikesevalguse sattumist lehtedele, mis vähendab fotosünteesi, pidurdab taime kasvu, põhjustab lehtede enneaegset väljalangemist ja muudab teistele haigustele vastuvõtlikumaks (Morcillo *et al.*, 2015). Jahukastme esinemisel pritsiti taimi kord nädalas esialgu rohelise seebi vesilahusega (lahjendus vastavalt tootja juhistele), kuid paari kuu möödumisel vahetati seebi lahus piima ja vee segu (võrdses koguses 3,5% piima ja kraanivett) vastu välja.

2.2.6 Kolonisatsiooni määramine

Mükoriisa kolonisatsiooni vaadeldi esimese katse seemikute puhul esmalt 7 ja seejärel 13 kuu möödumisel. Täpsema tulemuse saamiseks vaadeldi kõiki nakatatud seemikuid erineva substraadi ja eoste manustamise kombinatsioonil. Teise katse puhul vaadeldi igast töötlusest kuni 10 seemikut. Kolonisatsiooni määramiseks eemaldati seemikud substraadist, pesti juured õrnalt kraaniveega puhtaks ja asetati veega täidetud Petri tassi. Kolonisatsioon määrati visuaalse vaatlemise teel, kasutades Leica EZ4 stereomikroskoopi, 8-35-kordse suurendusega. Mükoriisete juuretippude osakaalu hindamiseks vaadeldi igal seemikul kogu juuresüsteemi ja määrati protsentuaalne kolonisatsioonitase. Katkiseid mükoriisseid juuretippe osakaalu hindamisel ei arvestatud. Ektomükoriisa tuvastati talle iseloomuliku anatoomia ja morfoloogia põhjal visuaalselt, järgides juhendina veebilehel avaldatud infot⁴ ja artiklites Chevalier & Frochot (1997) (viidatud artiklis Weden *et al.*, 2009) ja Benucci *et al.*, (2012b) kirjeldatud tunnuseid.

Vaatluse ajal võeti DNA prooviks juuretippe, mis sobisid liigi *T. aestivum* morfoloogilise kirjeldusega. Samuti võeti DNA prooviks juuretippe, millel oli moodustunud ektomükoriisa, kuid ei sarnanenud täpselt morfoloogilise kirjeldusega. Prooviks võetud juuretipud säilitati CTAB puhvrts (1% Tsetüültrimetüülammoonium-bromiid, 100 mM Tris–HCl (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA) molekulaarseks analüüsiks.

2.2.7 Molekulaarsed meetodid

Liigi *T. aestivum* molekulaarseks tuvastamiseks eraldati ektomükoriisestest juuretippudest DNA, kasutades komplekti Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA,

⁴ Vaata <http://www.deemy.de/taxa/ItemDescription.cfm?ItemID=288>

USA). Ribosomaalse DNA amplifitseerimiseks kasutati universaalset praimerit ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') ja liigi *T. aestivum* spetsiifilist ITS2TubA-F (5'-GTAGACGCTGGTGTTAGC-3') praimerit, mis kombineeriti universaalse praimeriga ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Kahe viimase praimer kombinatsioon annab liigi *T. aestivum* olemasolu korral ligikaudu 190 aluspaari pikkuse PCR-produkti.

PCR-i reaktsioonid viidi läbi mahus 25 µl. Reaktsioonisegu sisaldas 5 µl 5x HOT FIREPol Blend Mastermix Ready to Load valmisegu (Solis BioDyne, Tartu, Eesti), 0.5 µl nii pärisuunalist kui vastassuunalist praimerit (20 µM), 1 µl märklaua-DNA-d ja lõppmahuni ddH₂O-d. PCR-i reaktsioonid viidi läbi programmeeritavas termotsükleris (Eppendorf Mastercycler EP S, Eppendorf, Hamburg, Saksamaa). DNA fragmentide amplifitseerimiseks kasutatud programm on toodud tabelis 3.

Tabel 3. PCR programm.

	Temperatuur (°C)	Aeg	Kordused
Algne denaturatsioon	95 °C	15 min	1x
Denaturatsioon	95 °C	30 s	35x
Praimeri seondumine	55 °C		
Ekstensioon	72 °C	1 min	
Ekstensioon	72 °C	10 min	1x
Produktide säilitamine	4 °C		

Produktid lahutati 1% agarosgeelis geelelektroforeesil 1x TBE puhvril (45mM Tris Base, 45mM boorhape, 1 mM EDTA) ja visualiseeriti UV-valguses, kasutades pikkusmarkerina 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne, Tartu, Eesti). Molekulaarne analüüs tehti kokku 84 vaatluse ajal kogutud proovile.

PCR-i järgselt puhastati esimese katse produktid Exo-Sap (Sigma, St Louis, MO, USA) ensüümide abil kasutamata jäänud praimeritest ja desoksüribonukleotiididest. Puhastatud PCR-produktid saadeti praimeriga ITS5 (White *et al.*, 1990) DNA järjestuse sekveneerimiseks firmasse Macrogen (Amsterdam, Holland). Sekveneerimiseks saadeti liigile *T. aestivum* tüüpiline morfotüüp ja morfotüübid, mis võiksid potentsiaalselt kuuluda kontamineerivatele seentele. Kokku sekveneeriti 7 DNA proovi. Sama teostatakse ka teise katse puhul.

2.2.8 Järjestuste töötlemine

Sekveneerimise käigus saadud järjestused koondati kontiigideks ning töödeldi programmis Sequencher 5.1 (GeneCodes Corp., Ann Arbor, MI, USA). Saadud järjestuste taksonoomilise kuuluvuse kindlaks tegemiseks kasutati BLASTn otsingut andmebaasides INSD (International Nucleotide Sequence Databases) ja UNITE (Abarenkov *et al.*, 2010). Sekveneerimisandmete analüüsi teostas Leho Tedersoo.

2.2.9 Statistiline analüüs

Substraadi ja eoste manustamise viisi mõju seemikute kolonisatsioonitaseme hindamiseks kasutati ühe- ja kahefaktorilist dispersioonianalüüsi (ANOVA) programmis Statistica (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Faktorite tasemete erinevuste hindamiseks kasutati *Unequal n Honestly Significant Difference* testi. Illustreerimiseks arvutati kolonisatsioonitaseme põhjal iga töötluse kohta standardviga ja 95% usaldusintervall.

2.3 Tulemused

Mõlema katse puhul oli nakatamisest kuu aja möödumisel märgata kasvukapis ja toatemperatuuril kasvavate seemikute lehtedel tamme-jahukastet. Jahukastme tõrjumine rohelise seebi lahusega tõstis märgatavalt iga substraadi pH väärtust, muutes esimeses katses kasutatud substraadid tamme seemikute kasvamiseks ebasobivaks ja liigi *T. aestivum* ektomükoriisa moodustamiseks vähem soodsaks (tabel 4). Mõõtmise näitas, et pritsimislahuse pH väärtus oli 10,53. Seebi lahuse asendamisel piima-vee lahusega (pH 6,92) langes 5 kuu jooksul mõnevõrra kõikide substraatide pH väärtus, kuid jäi siiski suvitruhvli looduslike kasvukohtade pH väärtusest (6,6-8,4) suuremaks (tabel 4).

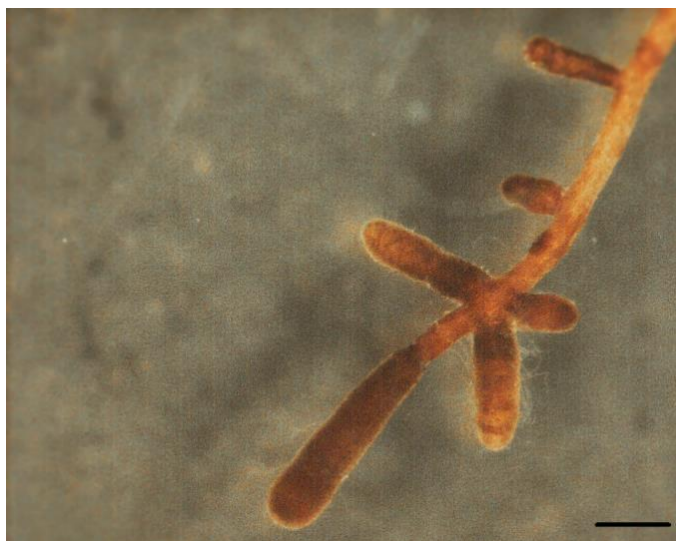
Tabel 4. Substraatide pH väärtuse muutus rohelise seebi kasutamisel (7 kuud) jahukastme eemaldamisel ja vältimisel ja selle asendamisel piima lahuse vastu (5 kuud).

Substraat	pH katse alguses	pH muutus rohelise seebi lahusega	pH muutus piima-vee lahusega
1L1T	6.97	9.68	9.59
1L1T0.2S	7.07	9.62	9.46
1L1T0.5K	7.24	9.61	9.38
1L1T0.2C	7.25	9.57	9.51
1L1T0.1A	9.59	9.92	9.66
1L1T0.5Sõ	8.08	9.56	9.44
2L2T0.1A0.2K0.1S 0.2C0.2Sõ	8.79	9.95	9.81

Kuigi teise katse raames kasutati jahukastme tõrjumiseks algusest peale vaid piima-vee lahust (joonis 9), mille pH väärtus on seemikute kasvatamiseks kasutatud substraadi (pH 7,24) omast madalam, tõusis substraadi pH väärtus nii kasvukapis kui toatemperatuuril. Nelja kuu möödumisel mõõdeti kasvukapis oleva substraadi pH väärtuseks 8,72 ja toa temperatuuril asuva substraadi pH väärtuseks 8,41.

Hoolimata substraatide pH väärtuste suurenemisest, oli esimeseks kolonisatsiooni määramise ajaks märgata liigile *T. aestivum* iseloomuliku morfoloogiaga juuretippe. Mükoriissed juuretipud olid mittemükoriisete juuretipudega võrreldes nüia-kujulised (joonis 4). Mükoriisete juuretipude värvus varieerus enamasti helepruunist tumepruunini, kuid teise katse seemikutel oli märgata väga heledaid juuretippe. Juuretipu ots oli tavaliselt ülejäänud juuretipust oluliselt heledam, kuid esines ka ühtlaselt värvunud juuretippe. Samuti esines

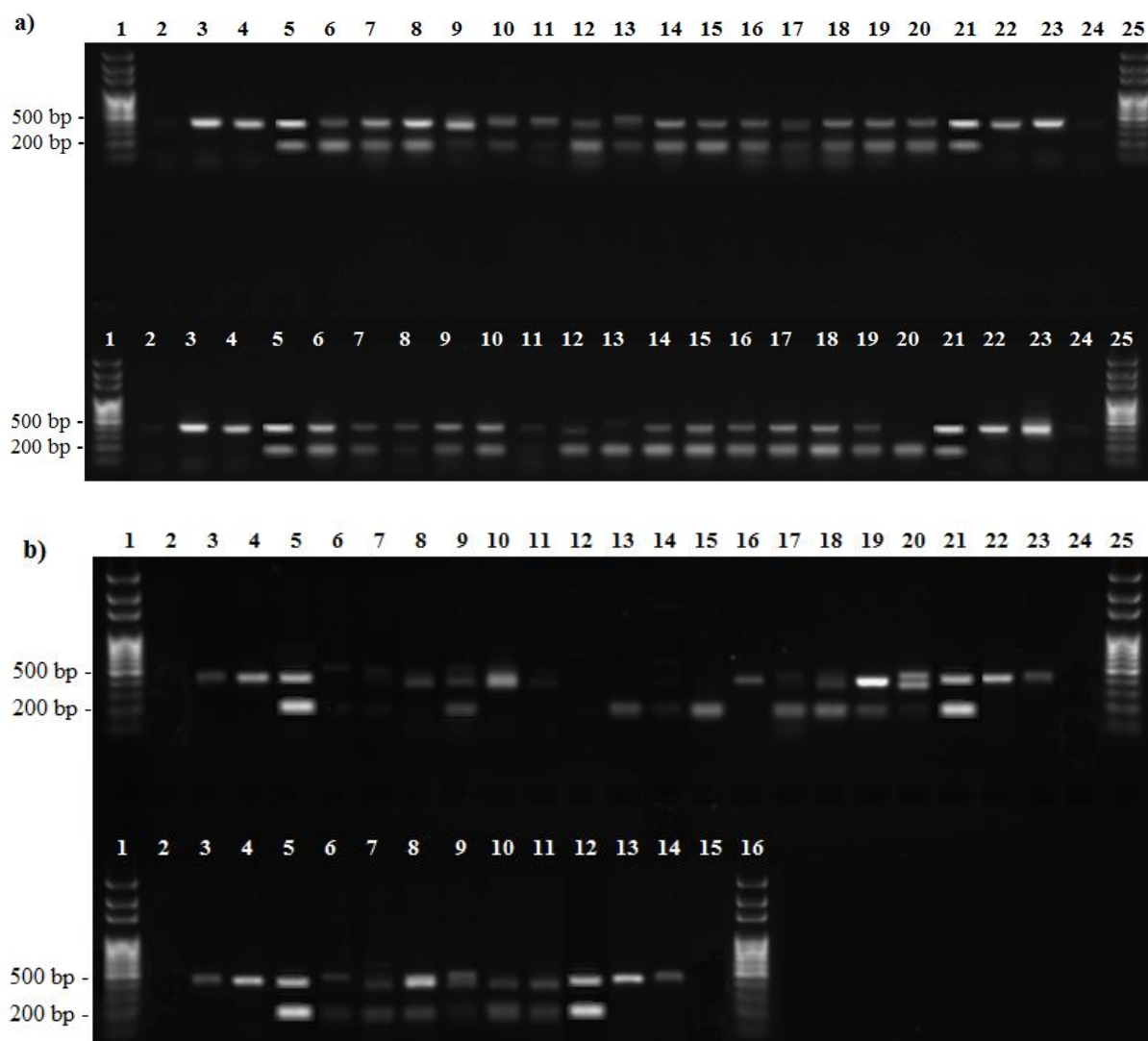
juuretippudel tsüstiide ja mantlikihtidest väljaulatuvaid hüüfe. Kui esimese katse kõrgema kolonisatsioonitasemega seemikutel olid mükorriised juuretippud juuresüsteemis ühtlaselt jaotunud, siis teise katse vaadeldud seemikutel esinesid mükoriissed juuretippud juurekaela läheduses asuvatel peenjuurtel.



Joonis 4. (foto: K. Onemar). Liigiga *Tuber aestivum* mükoriisa moodustanud harilik tamm (*Q. robur*). Mõõtjoone pikkus 500 μm.

Mükoriissetest juuretippudest eraldatud DNA amplifitseerimisel liigile *T. aestivum* spetsiifilise praimeriga (ITS2TubA-F) kinnitas mõlema katse seemikute puhul, et visuaalsel vaatlusel liigiks *T. aestivum* hinnatud juuretippud andsid tulemuseks liigile omase suurusega produkti (joonis 5). Ka juuretippud, mille morfotüüp erines tüüpilisest liigile *T. aestivum* omasest morfotüübist, andsid liigile omase suurusega produkti. ITS regioonide sekveneerimine ei tuvastanud esimese katse analüüsitud juuretippudelt ühtki konkureerivat seent, andes tulemuseks suvitruhvlile omase DNA järjestuse.

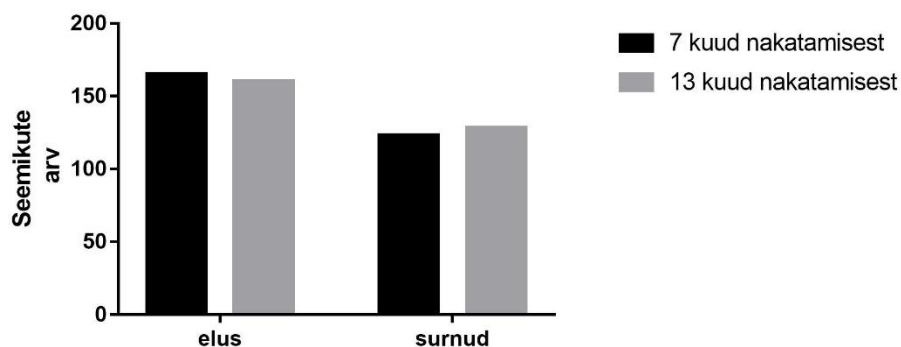
Esimese vaatluse ajaks olid suvitruhvliga mükoriisa moodustanud 83% (165 seemikust 138) seemikutest, kuid suuremal osal nakatunud seemikutest (84 seemikul) jäi kolonisatsioonitase alla 10%. Teise vaatluse ajaks (13 kuu möödumisel nakatamisest) oli suvitruhvliga mükoriisa moodustanud 80% seemikutest (160 seemikust 129), millest vaid 43 seemikul jäi kolonisatsioonitase alla 10%. Samuti oli mõlema vaatluse ajal märgata, et umbes pooltel seemikutel oli juuresüsteem vähe arenenud, mis tähendab, et lateraalseid juuri ja lühijuuretippe oli vähe. Ka oli peaaegu kõikidel seemikutel märgata keerdunud peajuurt, mis paiknes substraadis spiraalsena.



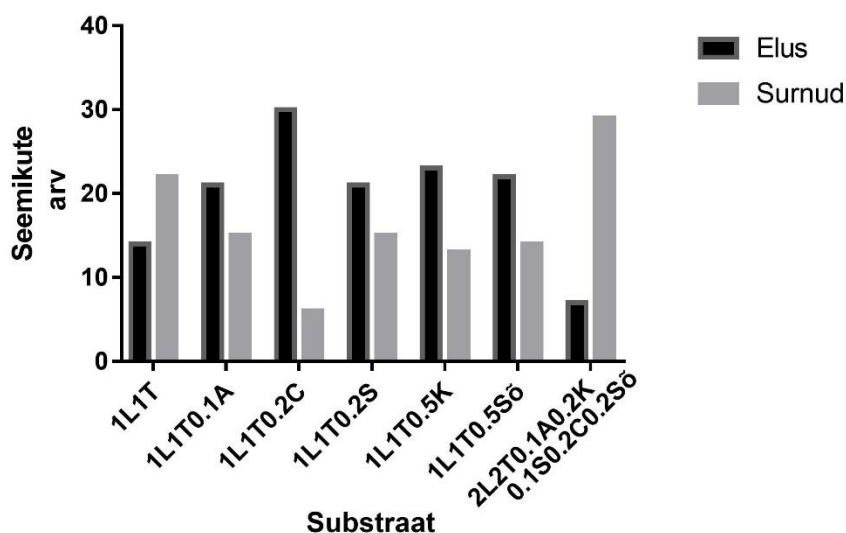
Joonis 5. Liigi *T. aestivum* spetsiifilise parimeri ITS2TubA-F ja universaalse praimer ITS4 kombinatsioonil saadud ligikaudu 190 aluspaari pikkused PCR-produktid. a) radadel 1 ja 25, DNA redel (Solis BioDyne); radadel 2 ja 24, kontroll; radadel 3 ja 23, negatiivne kontroll *Tomentella*; radadel 4 ja 22, negatiivne kontroll perekonnast *Tuber*; radadel 5 ja 21, *T. aestivum* viljakeha (positiivne kontroll); radadel 6-20 esimese katse juuretippude proovid nakatamisest 7 kuu möödumisel. Sama kehtib ka alumise rea kohta. **b)** radadel 1 ja 25, DNA redel (Solis BioDyne); radadel 2 ja 24, kontroll; radadel 3 ja 23, negatiivne kontroll perekonnast *Tuber* (*Tuber puberulum* grupp); radadel 4 ja 22, negatiivne kontroll pilviku perekonnast (*Russula aeruginea*); radadel 5 ja 21, positiivne kontroll, liigi *T. aestivum* viljakeha; radadel 6-14 esimese katse teine vaatlus; radadel 15-20, teise katse juuretippude proovid. Alumine rida, radadel 6-11, teise katse juuretippude proovid.

Esimese katse puhul esines seemikute suur suremus (joonis 6), mis teise kolonisatsiooni määramise ajaks suurenes veelgi. Seemikute suremus erines kasvuks kasutatud substraadidel ja statistiliselt olulisel määral ($F_{6,260}=8,03$; $P<0,001$). Kõige rohkem seemikuid jäi nakatamisest 13 kuu möödumisel ellu 1L1T0.2C substraadis ja kõige vähem seemikuid substraadis 2L2T0.1A0.2K0.1S0.2C0.2Sõ (joonis 7). Samas ei mõjutanud seemikute suremust oluliselt

eoste manustamise viis ($F_{3,260}=2,40$; $P=0,0679$). Kõige madalam suremus oli suspensiooni töötlusel ja kõige kõrgema seemikute suremusega olid geeli töötlused.

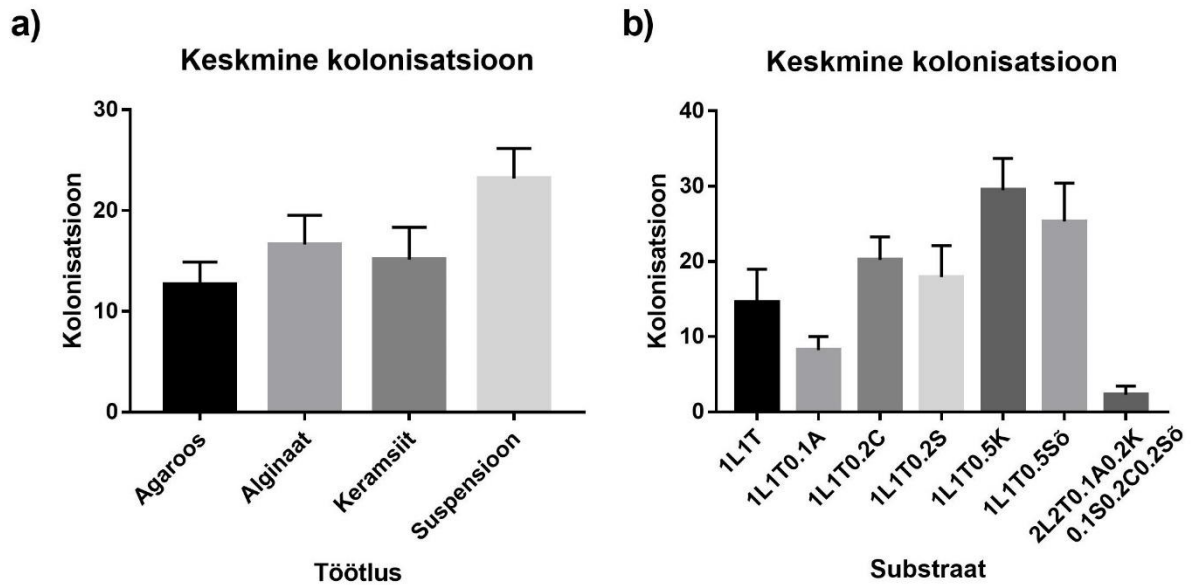


Joonis 6. Elus ja surnud seemikute arv nakatamisest 7 ja 13 kuu möödumisel esimeses katses.



Joonis 7. Seemikute elumus katses kasutatud substraadide lõikes 13 kuu möödumisel nakatamisest.

Kolonisatsioonitase erines substraadide vahel märgatavalt ($F_{5,133}=4,71$; $P<0,001$). Katses kasutatud kolm substraati (1L1T0.5K, 1L1T0.5Sõ ja 1L1T0.2C) andsid ülejäänud nelja substraadiga võrreldes oluliselt paremad tulemused, saades keskmiseks kolonisatsioonitasemeks vastavalt 29%, 25% ja 20%. Kõige madalama kolonisatsioonitasemega olid seemikud, mis kasvasid 2L2T0.1A0.2K0.1S0.2C0.2Sõ substraadis, millele järgnes 1L1T0.1A. Keskmine kolonisatsioonitase oli neis vastavalt 2% ja 8% (joonis 8b). Samuti oli statistiliselt oluline kolonisatsioonitaseme erinevus eoste manustamise viiside vahel ($F_{5,133}=4,71$; $P<0,001$). Parimaks seemikute nakatamise meetodiks osutus suspensioon, kus keskmiseks kolonisatsioonitasemeks on 23% (joonis 8a).



Joonis 8. Seemikute keskmine kolonisatsioonitase esimeses katses kasutatud töötlustel (a) ja substraatidel (b) 13 kuu möödumisel nakatamisest.

Kuna teisel katsel oli vaatluse ajaks osade töötluste variantides vaid paar kordust, arvutati kolonisatsioonitaseme põhjal iga erineva töötluste jaoks standardviga ja usaldusintervall, mis näitasid, et teises katses kasutatud töötlusted ei erinenud üksteisest statistiliselt oluliselt nelja kuu möödumisel nakatamisest.



Joonis 9. (foto: K. Onemar) Teise katse viie kuu vanused hariliku tamme (*Q.robur*) seemikud peale piima-vee lahusega pritsimist.

2.4 Arutelu

Antud magistritöös läbi viidud katsete tulemuste põhjal sobib trühvliiliigiga *Tuber aestivum* nakatatud seemikute kasvatamiseks erinevate lisanditega substraadid. Seitsmest kasutatud substraadist andsid kõige paremaid tulemusi kolm substraati (lubjakivijahu, sõelmete ja keramsiidi graanulite lisandiga), milles kasvanud seemikute keskmine kolonisatsioonitase ulatus üle 20%. Eoste lisamise meetodist oli kõige efektiivsem suspensioon. Suspensiooniga nakatatud seemikute keskmine kolonisatsioonitase oli 23%.

Kuigi trühvliiliikide kultiveerimismeetodid on üksteisest mõnevõrra erinevad, peetakse mulla pH väärtust oluliseks teguriks trühvliiliigiga nakatunud seemikute kasvatamisel, trühvliistandustes seemikute kolonisatsiooni säilitamisel või isegi suurendamisel ja viljakehade moodustamisel. Liigi *T. aestivum* looduslikes kasvukohtades on mulla pH väärtus vahemikus 6,8-8,4 (Chevalier & Sourzat, 2012), kuid nakatatud seemikute kasvatamisel on parima kolonisatsioonitaseme saavutamiseks soovitatud kasutada substraati, mille pH väärtus on ligikaudu 7,1 (Pruett, 2008). Suvitrühvliga nakatatud seemikute kasvatamisel „tüüpilise“ substraadiga, mis koosneb peamiselt turbast ja liivast, saavutati aastaga keskmiseks kolonisatsioonitasemeks umbes 27% (Pruett *et al.*, 2008a). Märgati, et substraadi pH väärtusel üle 7,5 väheneb kolonisatsioon (Pruett, 2008). Samas pole näidatud, et 7,1 oleks kõrgeim pH väärtus, millega saavutatakse seemikute parim kolonisatsioonitase. Antud magistritöö raames läbi viidud katse tulemused pole otseselt mainitud tulemusega võrreldavad, sest puuduvad andmed, millal tõusis substraadi pH väärtus üle 9. Arvestades elus seemikute keskmist kolonisatsiooni, saavutavad kaks substraati (1L1T0.5K, 1L1T0.5Sõ) sarnase tulemuse (keskmine kolonisatsioonitase vastavalt 29% ja 25%). Seega võiks arvata, et seemikute kõrge kolonisatsioonitaseme tekkimine on võimalik ka pH väärtusel üle soovitatava 7.1.

Kõrge substraadi pH väärtus võib soodustada trühvliiliikide mükoriisa moodustumist (Thomas, 2012), kuid samuti muudab see mikrotoitained taimele raskesti kättesaadavaks, põhjustades kloroosi ja taimede aeglase kasvu. Seetõttu pole soovitatud tõsta substraadi pH väärtust üle 8 (Hall *et al.* 2007). Kõrge pH väärtus võiks olla põhjuseks, miks oli seemikute suremus esimese katse puhul niivõrd suur. Kahe esimese katses kasutatud substraadi (2L2T0.1A0.2K0.1S0.2C0.2Sõ ja 1L1T0.1A) pH väärtus oli suurem kui suvitrühvli looduslikes kasvukohtades (tabel 4), kuid sellegipoolest oli kõrgeima pH väärtusega substraadi (1L1T0.1A) seemikute suremus väiksem võrreldes pH väärtuse suuruselt teise substraadiga (2L2T0.1A0.2K0.1S0.2C0.2Sõ) (joonis 7). Võttes arvesse ühesuguseid kasvutingimusi, seemikute päritolu ja nakatamismaterjali, on raske leida põhjust, miks kõrgema pH väärtusega substraadil on seemikute suremus oluliselt väiksem kui mitmel katse alguses väiksema pH väärtusega substraadil.

Kuigi teise katse seemikutel kasutati tamme-jahukastme tõrjumiseks vaid piima-vee lahust (pH 6,92), tõusis nelja kuuga substraadi pH väärtus märgatavalt. Enne katse algust mõõdeti substraadi 1L1T0.2C pH väärtuseks 7,24, kuid neli kuud hiljem oli pH väärtus tõusnud üle 8. On näidatud, et mõned trühvliliigid (*T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. indicum*) tõstavad pH väärtust, tekitades peremeestaimede stressi, mille vastuseks suurendab taim juuretippude arvu, soodustades omakorda mükoriisa moodustumist (Garcia-Montero *et al.*, 2009). Samas pole pH taseme tõus antud juhul seotud liigi *T. aestivum* mõjuga substraadi pH väärtusele, sest vaadeldud seemikutel (86) oli mükoriisa moodustumist märgata 40% (35 seemikul), kuid kolonisatsioonitase oli väga madal ja tõrude nakatamisest möödunud vaid 4 kuud. Üheks pH väärtuse suurenemise põhjuseks on kastmisveena kasutatud kraanivee pH väärtus (7,85), kuid samas ei selgita see nii ulatuslikku tõusu. pH väärtuse suurenemise põhjuseks on ilmselt substraadi homogeniseerumine ja leeliseliste ühendite liikumine lisandist (lubjakivijahust) põhisubstraati.

Mükoriisete juuretippude paiknemine juurekaela läheduses asuvatel külgiuurtel esines just seemikutel, mis kasvasid suspensiooniga töödeldud tõrudest. Põhjuseks on ilmselt eoste paiknemine ülemises substraadi kihis, mistõttu on raskendatud uute lühijuuretippude nakatumine seeneniidistiku aeglase kasvu tõttu. Tõrude nakatamisest umbes 4 kuu möödumisel oli seemikutel hästi arenenud peajuur, mis ulatus istutuspoti (sügavus 15,5 cm) põhjani välja. Seetõttu annaks tõrude nakatamisel parema tulemuse substraadi segamine kindla koguse eoste suspensiooniga, mis peaks eosed jaotama ühtlaselt üle terve substraadi laiali. Tõrude kasvatamine trühvlieostega segatud substraadis ühe aasta jooksul andis keskmiseks kolonisatsioonitasemeks ~30% (Pruett, 2008). Selline keskmine kolonisatsioonitase pole näiteks juurte suspensiooni kastmisest tulemuslikum (Benucci *et al.*, 2012b), kuid istanduse loomisel on seemiku ja trühvlite ellujäämisel tähtis mükoriisete juuretippude ühtlane jaotumine juuresüsteemis. Et säilitada mükoriisa moodustamiseks piisavalt suur eoste kontsentratsioon substraadis, nõuab suurema mahuga istutuspottide kasutamine suspensiooni segamisel substraadiga suuremat viljakeha kogust iga seemiku jaoks. Selline nakatamine pole mõistlik, kui eesmärgiks on nakatada suur hulk seemikuid.

Mitmes artiklis (Donnini *et al.*, 2014; Weden, 2004; Benucci *et al.*, 2012b) on näidatud nakatatud seemikute kolonisatsioonitase suurenemist aja jooksul. Kõrgeim kolonisatsioonitase saavutatakse seemikute nakatamisest kolme aasta möödumisel (Donnini *et al.*, 2014). Kolonisatsioonitase suurenemine toimus ka esimese katse seemikute puhul. Võrreldes kolonisatsiooni nakatamisest 7 ja 13 kuu möödumisel, suurenes keskmine kolonisatsioonitase märgatavalt (10% kuni 17%, arvestades kõiki substraate).

Ümberistutamiseks sobiva kolonisatsioonitaseme saavutamiseks soovitatakse nakatatud seemikuid kasvatada kontrollitud tingimustel 1-2 aastat (Weden *et al.*, 2009). Kasvukohta istutamisel peetakse ideaalseks umbes kahe aasta vanuseid seemikuid, mis oleksid võimelised trühvli eelistatud kasvutingimustes ellu jääma (Chevalier & Sourzat, 2012). Lastes esimese katse seemikutel kontrollitud tingimustel veel paar kuud kasvada, suureneks seemikute kolonisatsioonitase veelgi, mistõttu saavutaks rohkem seemikuid ümberistutamiseks sobiva kolonisatsiooni, kuid samas jääks seemikute vanus ümberistutamiseks sobivaks.

Ümberistutamiseks sobiva kolonisatsioonitaseme teket mõjutavad mitmed erinevad tegurid. Nendeks on näiteks eoste suspensiooni kogus nakatamisel, seemikute kasvatamiseks kasutatud substraat ja kasvupoti suurus (Hall *et al.*, 2007). Kasvupoti suurus ja kuju on olulised seemikul haruneva juuresüsteemi arenemiseks ja nakatamiseks kasutatava suspensiooni koguse optimeerimisel (Palazon & Barriuso, 2007, viidatud artiklis Iotti *et al.*, 2012). Liiga väike kasvupott võib pärssida juuresüsteemi arengut, kuid nakatamiseks kasutatud suspensiooni segatakse väiksema substraadi kogusega, mis võib kolonisatsioonitaset suurendada. Näiteks saadi 183 cm³ kasvupotis tõrude kasvatamisel ühe aasta möödumisel seemikute keskmiseks kolonisatsioonitasemeks ~30% (Pruett, 2008), kuid 310 cm³ suuruse kasvupoti kasutamisel oli liigiga *T. aestivum* 11 kuu möödumisel nakatunud vaid 34% seemikutest (Weden *et al.*, 2009), mistõttu tuleks keskmiseks kolonisatsioonitasemeks 30% oluliselt väiksem arv. Suurema koguse substraadiga jaotub sama arv eoseid suuremale pinnale laiali. Nii võivad eosed sattuda seemiku juurtest kaugemale ega pruugi idanema hakata. Istutuspoti suurus võiks seega sõltuda sellest, kas trühvlieostega nakatatakse seemikuid või tõrusid. Seemikute nakatamisel on ilmselt parem kasta juuri suspensiooni ja kasutada suuremat potti, et areneks harunev juuresüsteem. Oluline on kasutada istutuspotti, mis võimaldab peajuurel kasvada potist välja, et vältida peajuurel poti põhjas spiraalide moodustumist. Potist välja kasvanud juurte kärpimine soodustab lateraalsete juurte teket (Ruestes, A.O., personaalne info), mis omakorda soodustab mükoriisa moodustumist. Tõrude nakatamisel tuleks kasutada jällegi väiksema mahuga istutuspotti ja suspensioon segada substraadiga. Paari kuu möödumisel, kui mükoriisa on juba tekkinud, oleks ilmselt vajalik tõrust kasvanud seemik istutada juuresüsteemi parema arenemise jaoks suuremasse potti, lisades algsele substraadi kogusele kuni vajaliku mahuni substraati juurde. Mõlemas katses kasutati istutuskassetti, mille ühe poti mahuks oli 265 cm³. Seetõttu sobiks selline istutuskassett pigem tõrude nakatamiseks ja kasvatamiseks, sest rohkem kui pooleteist aasta vanustel seemikutel (13 kuu möödumisel nakatamisest) oli istutuspott juuri tihedalt täis kasvanud.

Lisaks eelnevalt mainitud tingimustele, mõjutab kolonisatsiooni moodustumist nakatamisperioodil kastmine, õhu ja substraadi temperatuur, valguse intensiivsus ja pikkus, substraadi pH, toitainete kontsentratsioon ja konkureerivad seemed (Hall & Wang, 1998). Trühvlite kasvuks sobivatel muldadel on üheks olulisemaks tingimuseks hea veeringlus (Chevalier & Sourzat, 2012). Sama kehtib ka substraadide kohta. Trühvlite kasvuks ei sobi seisva veega substraadid, mispärast on oluline kasta seemikuid alles siis, kui substraat on enam-vähem kuiv ja mitte hoida substraati pidevalt märjana.

Majanduslikel põhjustel soovitatakse trühvliliigiga nakatada alles 2-3 kuu vanuseid seemikuid. Sellisel juhul ei kulutata eoste suspensiooni tõrudele, mis ei hakka idanema. Selliseid tõrusid on tavaliselt 40-60%. Seemikute kasvatamine aga kauem kui kolm kuud on kulukam, sest sel juhul peaks seemik sobiva kolonisatsioonitaseme saavutamiseks kasvama ühe hooaja asemel kaks hooaega (Weden, 2004). Teises katses hakkas nakatatud tõrudest idanema 84% kasvukapis kasvanud tõrudest ja 62% toatemperatuuril kasvanud tõrudest. Kasvatades tõrusid mõned kuud enne eoste suspensiooni kasutamist, oleks saanud hakkama väiksema suspensiooni kogusega või antud kogusega nakatada rohkem tõrusid. Mida nooremad on nakatamisel kasutatavad taimed, seda rohkem on neil aega mükoriisa moodustamiseks enne ümberistutamist. Samas nakatati Rootsis 1,5-aastaseid seemikuid, kuid 11 kuu möödumisel oli mükoriisa moodustunud vaid 34% kõigist nakatatud seemikutest (Weden *et al.*, 2009). Mükoriisa moodustanud seemikute väikese osakaalu põhjuseks võis olla nakatavate seemikute vanus. Kuna 1,5-aastaste seemikute juuresüsteem oli niivõrd arenenud, polnud võimalik eelnevat kasvusubstraati juurte ümbert eemaldada ja seemikud istutati koos sellega uude substraati. Seetõttu võisid trühvlieosed asuda seemiku juurtest idanemiseks või mükoriisa moodustamiseks liiga kaugel.

Rootsis teostati pilootprojekti raames seemikute nakatamine trühvliliigi *T. aestivum* eoste suspensiooniga. Seemikute kolonisatsioonitase määrati 4,5 ja 11 kuu möödumisel nakatamisest. Esimese vaatluse ajaks oli mükoriisa tekkinud 20% hariliku tamme seemikutel ja teise vaatluse ajaks 53% hariliku tamme seemikutel (Weden *et al.*, 2009). Antud magistritöö raames oli eoste suspensiooniga nakatatud seemikutest 7 kuu möödumisel mükoriisa moodustunud 90% seemikutest ja 13 kuu möödumisel 89% seemikutest. Kuigi pole teada, kui suur osa seemikutest oli suvitrühvliga mükoriisa moodustanud nakatamisest 4 kuu möödumisel, erines tulemus Rootsis tehtud katsest märkimisväärselt juba 7 kuu möödumisel. Erinevuse peamiseks põhjuseks on ilmselt ühe seemiku kohta kasutatud eoste kontsentratsioon, sest on teada, et suurema eoste kontsentratsiooniga tekib kolonisatsioon kiiremini (Hall *et al.*, 2007). Kui Rootsi katses sisaldas suspensioon ühe seemiku kohta umbes 5×10^6 eost, siis antud töö raames oli eoste kontsentratsioon suspensioonis $1,37 \times 10^7$. Teiseks põhjuseks võib olla asjaolu, et Rootsis läbi

viidud katses segati suspensioon substraadiga ühtlaselt, kuid antud töös kasteti seemiku juured suspensiooni ja ülejäänud suspensioon valati istutuspotti juurtele peale. Suspensiooni meetodiga viiakse eosed taimejuurtele võimalikult lähedale ja ilmselt seetõttu toimub vastastikune signalisatsioon paremini ehk seenehüüfid suudavad taimejuure kiiremini üles leida ja koloniseerida.

Suure kolonisatsioonitaseme võib saada ka vähem kui kahe aasta möödumisel nakatamisest. Pekaanipuu (*Carya illinoensis*) seemikute nakatamine liigi *T. aestivum* eoste suspensiooniga saavutati suur kolonisatsioonitase juba 10 kuu möödumisel nakatamisest. Kümnest vaadeldud seemikust oli nelja seemiku kolonisatsioonitase üle 50%, samal ajal kui madalam kolonisatsioonitase oli 8%. Keskmiseks kolonisatsioonitasemeks seemikutel oli 42% (Benucci *et al.*, 2012b), mis on oluliselt kõrgem kui antud töös saadud seemikute keskmine kolonisatsioonitase.

Antud töös saadud tulemused näitavad, et hariliku tamme nakatamine liigi *T. aestivum* eostega on võimalik ka lihtsates tingimustes, kuid kolonisatsioonitase on mõjutatud paljudest erinevatest teguritest, millest olulisemateks on seemikute kasvatamiseks kasutatud substraat ja selle pH väärtus, seemikute nakatamise meetod, istutuspoti suurus ja suspensiooniga nakatamise puhul kasutatud viljakehade küpsus, millest sõltub eoste kontsentratsioon.

Kokkuvõte

Trühvlid (*Tuber* spp.) on ektomükoriissed seened, mis moodustavad söödavaid maasiseseid viljakehi. Suvitrühvli peetakse üheks hinnatumaks söögiseeneks maailmas ning tema populaarsus maailma turul üha kasvab. Oma laialdase leviku tõttu on suvitrühvel on üks enim kultiveeritud trühvliliikidest maailmas ja tänaseks on suvitrühvliga nakatatud seemikutega loodud istandusi mitte ainult Euroopas, vaid üle terve maailma. Trühvlite viljakeha kõrge hinna tõttu napib seemikute nakatamise ja nakatatud seemikute kasvatamise kohta infot ja avalikkusele kättesaadav infot on tihti ebamäärane.

Antud magistritöö eesmärgiks oli nakatada Eesti päritolu hariliku tamme (*Q. robur*) seemikuid Eesti ja Gotlandi päritolu suvitrühvli viljakehadega, et leida nelja erineva eoste manustamise viisist seemikute nakatamiseks sobivaim. Samuti oli eesmärgiks nakatatud seemikute kasvuks ja kolonisatsiooni moodustamiseks sobivaima substraadi leidmine ja eelnevate parimate tulemuste kombineerimisel kasvatada suvitrühvliga nakatatud seemikuid edasise istanduseksperimenti tarvis.

Seemikud nakatati suvitrühvli eostega suspensiooni, keramsiidi graanulite, alginaat- ja agarosgeeli meetodil ja istutati seitsmesse erineva lisandiga substraati. Seemikute kolonisatsioon määrati juuresüsteemi visuaalsel vaatlusel stereomikroskoobiga ja saadud kolonisatsioonitasemeid analüüsiti dispersioonanalüüsiga (ANOVA). Kolm substraati osutusid seemikute kolonisatsiooni moodustumisel teistest paremaks, andes seemikute keskmiseks kolonisatsioonitasemeks 29%, 25% ja 20%. Eoste manustamise viisidest andis suspensiooni meetod kõige paremad tulemused - keskmine kolonisatsioonitase oli 23%. Molekulaarsed analüüsid kinnitasid, et hariliku tamme seemikutega mükoriisa moodustunud seeneks on suvitrühvel.

Läbiviidud katsete tulemused näitavad, et trühvliga nakatunud seemikute kolonisatsioonitaset mõjutavad mitmed erinevad tegurid, millest olulisemateks on seemikute kasvatamiseks kasutatud substraat ja selle pH väärtus, seemikute nakatamise meetod ja istutuspoti suurus.

Summary

Inoculation of oak seedlings with summer truffle (*Tuber aestivum*) spores

Kadri Onemar

Truffles (*Tuber* spp.) are ectomycorrhizal fungi that produce edible hypogeous fruit bodies. Summer truffle is one of the most prized delicacies in the world that has gained increasing popularity in the global market. Due to its broad distribution in Europe, summer truffle is one of the most cultivated truffle species. Nowadays, truffle orchards established from seedlings inoculated with summer truffle spores are found all over the world. Because of the high prices of truffle fruit bodies, techniques used for inoculating seedlings and their optimal growth conditions are kept secret and publicly available information is scant and contradictory.

The main objective of my thesis was to evaluate the effect of four different inoculation methods of Estonian common oak (*Q. robur*) seedlings with Estonian and Gotland summer truffle spores. The second aim was to find out, which substrates are the best for growing inoculated seedlings. Along with these experiments, I also intended to prepare inoculated seedlings for an experimental orchard for forthcoming field experiments.

Seedlings were inoculated with truffle spores contained in water suspension, keramsite granules, alginate and agarose gel and cultivated using seven different substrates. Seedling colonization was determined visually by stereomicroscope and colonization results were analysed using analysis of variance (ANOVA). Three substrates (with the addition of keramsite granules, screenings of limestone gravel and limestone powder) had significantly better results compared to others, giving an average seedling colonization of 29%, 25% and 20%. The best inoculation method was the water suspension method, with an average seedling colonization of 23%. Molecular analyses confirmed that oak seedlings were indeed colonized with summer truffle and remained free from competing ectomycorrhizal fungi.

The experiments indicate that colonization intensity of truffle-inoculated seedlings is affected by several factors such as the substrate, its pH value, the inoculation method and, potentially, the cell size of the plant container.

Tänuavaldused

Eelkõige soovin tänada oma juhendajaid Eveli Otsingut ja Leho Tedersood hindamatu abi ja väärtuslike nõuannete eest. Samuti soovin tänada Lilian Kadaja-Saarepuud, kelle tõttu sai võimalikuks eoste kontsentratsiooni määramine. Lisaks soovin tänada sõpru ja perekonda toetuse eest.

Kasutatud kirjandus

Abarenkov, K., Tedersoo, L., Nilsson, R. H., Vellak, K., Saar, I., Veldre, V., Parmasto, E., Prous, M., Aan, A., Ots, M., Kurina, O., Ostonen, I., Jõgeva, J., Halapuu, S., Põldmaa, K., Toots, M., Truu, J., Larsson, K. H. and Kõljalg, U. (2010). PlutoF – a web based workbench for ecological and taxonomic research with an online implementation for fungal ITS sequences. *Evol Bioinform* 6:189–196.

Andrés-Alpuente, A., Sánchez, S., Martín, M., Aguirre, A. J. and Barriuso, J. J. (2014). Comparative analysis of different methods for evaluating quality of *Quercus ilex* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum*. *Mycorrhiza* 24: 29-37.

Belloli, S., Bologna, F., Gregori, G. and Zambonelli, A. (2001). Il tartufo nero di Fragno (*Tuber uncinatum* Chatin): ecologia e coltivazione, pp 367–371. *In: Actes du Ve Congrès International Science et Culture de la Truffe et des Autres Champignons Hypogés Comestibles*. 4–6 March 1999. Aix-en-Provence, France. Fédération Française des Trufficulteurs, Paris.

Benucci, G. M. N., Bonito, G., Baciarelli-Falini, L., Bencivenga, M. and Donnini, D. 2012a. Truffles, Timber, Food, and Fuel: Sustainable Approaches for Multi-cropping Truffles and Economically Important Plants, p. 265-280. *In* Zambonelli, A. and Bonito, G. M. (ed.), *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*, Springer, Berlin.

Benucci, G.M.N., Bonito, G., Falini L.B. and Bencivenga, M. (2012b). Mycorrhization of Pecan trees (*Carya illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad. and *Tuber borchii* Vittad. *Mycorrhiza* 22: 383-392.

Berch, S. H. and Bonito, G. (2014). Cultivation of Mediterranean species of *Tuber* (*Tuberaceae*) in British Columbia, Canada. *Mycorrhiza* 24: 473-479.

Bonet, J. A., Oliach, D., Fischer, C., Olivera, A., Martinez de Aragon, J. and Colinas, C. 2009. Cultivation methods of the black truffle, the most profitable Mediterranean non-wood forest product; a state of the art review, p. (57)57-71. *In: Palahi, M., Birot, Y., Bravo, F. and Gorriz, E. (eds.) modelling, valuing and managing Mediterranean forest ecosystems for non-timber goods and services*. EFI Proceedings.

Bruhn, J. N., Mihail, J. D. and Pruett, G. E. (2013). Truffle seedling production method has long-term consequences for tree growth and root colonization. *Agroforest Syst.* 87: 679-688.

- Chevalier, G. (1998). The truffle cultivation in France: assessment of the situation after 25 years of intensive use of mycorrhizal seedlings. In Danell, E. (ed.), Proceedings of the First International Meeting on Ecology, Physiology, and Cultivation of Edible Mycorrhizal Mushrooms. Uppsala, Sweden.
- Chevalier, G. and Frochot, H. (1989). Ecology and possibility of culture in Europe of the burgundy truffle (*Tuber uncinatum* Chatin). Agric. Ecosyst. Environ. 28:71–73.
- Chevalier, G. and Frochot, H. 1997. *La Truffe de Bourgogne*. Pétrarque, Levallois-Perret.
- Chevalier, G. and Grente, J. (1979). Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne: production á grande échelle de plants mycorhizés par la truffe. Mushr. Sci. 10: 483-505.
- Chevalier, G. and Sourzat, P. 2012. Soils and techniques for cultivationg *Tuber melanosporum* and *Tuber aestivum* in Europe, p. 163-189. In Zambonelli, A. and Bonito, G. M., (eds.), Edible Ectomycorrhizal Mushrooms, Berlin.
- Diamandis, S. and Perlerou, C. (2008). Recent records of hypogeous fungi in Greece. Acta. Mycologica. 43(2):139–142.
- Domínguez, J., Rodríguez, J. and Saiz, J. (2005). Ectomicorrizas en dos plantaciones truferas de encina (*Quercus ilex* L. subsp. ballota (Desf.)Samp.) en Castellón. Bol. San. Veg. Plagas. 31: 147–157.
- Donnini, D., Benucci, G.M.N, Bencivenga, M. and Baciarelli-Falini, L. (2014). Quality assessment of truffle-inoculated seedling in Italy: proposing revised parameters for certification. Forest Systems 23(2): 385-393.
- Fraser, J. A. and Heitman, J. (2003). Fungal mating-type loci. Curr. Biol. 13: 792–795.
- Garcia-Montero, L. G., Moreno, D., Monleon, V. J. and Arredondo-Ruiz, F. (2014). Natural production of *Tuber aestivum* in central Spain: *Pinus* spp. Versus *Quercus* spp. Brûles. Forest Systems 23(2): 394-399.
- García-Montero, L. G., Quintana, A., Valverde-Asenjo, I. and Díaz, P. (2009). Calcareous amendments in truffle culture: a soil nutrition hypothesis. Soil Biol. Biochem. 41: 1227-1232.
- Giovannetti, G., Roth-Bejerano, N., Zanini, E. and Kagan-Zur, V. 1994. Truffles and their cultivation, p. 71-107. In Janick, J. (ed.), Horticultural Reviews, vol 16.

- Gogan Csorbaine, A., Bratek, Z. and Dimenyi, J. (2007). A new tool for rural development: truffle cultivation. *Cereal. Res. Commun.* 35(2):413–416.
- Gogan Csorbaine, A., Nagy, Z., Degi, Z., Bagi, I. and Dimenyi, J. (2012). Ecological characteristics of a Hungarian summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad.) producing area. *Acta Mycologica* 47(2):133–138.
- Gryndler, M., Černá, L., Bukovská, P., Hršelová, H. And Jansa, J. (2014). *Tuber aestivum* association with non-host roots. *Mycorrhiza*. 24: 603-610.
- Gryndler, M., Hršelová, H., Soukupová, L., Streiblová, E., Valda, S., Borovička, J., Gryndlerová, H., Gažo, J. and Miko, M. (2011). Detection of summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad.) in ectomycorrhizae and in soil using specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* 318: 84-91.
- Gryndler, M., Trilčová, J., Hršelová, H., Streiblová, E., Gryndlerová, H. And Jansa, J. (2013). *Tuber aestivum* Vittad. Mycelium quantified: advantages and limitations of a qPCR approach. *Mycorrhiza*. 23: 341-348.
- Hall, I. R. and Wang, Y. 1998. Methods for cultivating edible ectomycorrhizal mushrooms, p. 99-114. *In* A. Varma, (ed.), *Mycorrhiza manual*. Berlin.
- Hall, I. R. and Yun, W. (2002). Truffles and other edible mycorrhizal mushrooms - some new crops for the southern hemisphere, edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. *In* Yun, W., Danell, E. and Zambonelli, A. (ed.), *Proceedings from the 2nd International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*. Christchurch, New Zealand.
- Hall, I. R., Brown, G. T. and Zambonelli, A. 2007. Taming the truffle, p. 34-52, 61-63, 106-110, 121-152. Timber press, Portland.
- Hall, I. R., Zambonelli, A. and Primavera, F. (1998). Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 3. *Tuber magnatum*, Tuberaceae. *Econ. Bot.* 52(2): 192-200.
- Hall, I.R., Yun, W. and Amicucci, A. (2003). Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends. Biotechnol.* 21(10): 433-438.
- Iotti, M., Amicucci, A., Stocchi, V. and Zambonelli, A. (2002). Morphological and molecular characterization of mycelia of some *Tuber* species in pure culture. *New Phytologist*. 155: 499-505.

- Iotti, M., Piattoni, F. and Zambonelli, A. 2012. Techniques for Host Plant Inoculation with Truffles and Other Edible Ectomycorrhizal Mushrooms, p 145-161. In Zambonelli, A. and Bonito, G. M., (eds.), Edible Ectomycorrhizal Mushrooms, Berlin.
- Jeandroz, S., Murat, C., Wang, Y., Bonfante, P. and Le Tacon, F. (2008). Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the „true truffles“. J. Biogeogr. 35: 815-829.
- Lanza, B., Owieczarek, M., De Marco, A. and Raglione, M. (2004). Evaluation of phytotoxicity and genotoxicity of substances produced by *Tuber aestivum* and distributed in the soil using *Vicia faba* root micronucleus test. Fresen. Environ. Bull. 13: 1410–1414.
- Mamoun, M. and Olivier, J. M. (1997). Mycorrhizal inoculation of cloned hazels by *Tuber melanosporum*: Effect of soil disinfestation and co-culture with *Festuca ovina*. Plant and Soil 188(2): 221-226.
- Marjanovic, Z., Grebenc, T., Markovic, M., Glisic, A. and Milenkovic, M. (2009). Ecological specificity and molecular diversity of truffles (genus *Tuber*) originating from mid-west of the Balkan Peninsula. Sydowia 62(1): 67–87.
- Mello, A., Murat, C. and Bonfante, P. (2006). Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. FEMS Microbiol. Lett. 260: 1–8.
- Molinier, V., Bouffaud M-L., Castel, T., Mounier, A., Colombet, A., Recorbet, G., Frochot, H. and Wipf, D. (2013b). Monitoring the fate of a 30-year-old truffle orchard in Burgundy: from *Tuber melanosporum* to *Tuber aestivum*. Agroforest Syst. 87: 1439-1449.
- Molinier, V., van Tuinen, D., Chevalier, G., Gollotte, A., Wipf, D. and Redecker, D. (2013a). A multigene phylogeny demonstrates that *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum* are conspecific. Org. Divers. Evol. 13: 503-512.
- Morcillo, M., Sánchez, M. and Vilanova, X. 2015. Truffle farming today: a comprehensive world guide, p. 305. Micologia Forestal ja Aplicada, Spain.
- Murat, C. (2015). Forty years of inoculating seedlings with truffle fungi: past and future perspectives. Mycorrhiza. 25: 77-81.
- Murat, C., Mello, A., Vizzini, A. and Bonfante, P. 2008a. Edible Mycorrhizal Fungi: Identification, Life Cycle and Morphogenesis, p. 707-732. In Varma, A. (ed.), Mycorrhiza, 3rd ed., Springer, Berlin.

- Murat, C., Zampieri, E., Vizzini, A. and Bonfante, P. (2008b). Is the Perigord black truffle threatened by an invasive species? We dreaded it and it has happened! *New Phytol.* 178(4): 699-702.
- Palazón, C. and Barriuso, J. 2007. Vivero y producción de plantas micorrizadas, pp 209–236. *In: Domenech, R. (ed.), Fundamentos y técnicas.* Ediciones Mundi-Prensa, España.
- Palazón, C., Delgado, I., Cartié, G., Barriuso, J. and Esteban, H. (1999). Propuesta de un método de evaluación y control de calidad de planta (*Quercu* spp.) micorrizada con *Tuber melanosporum* Vittad., para la obtención, en España, de la etiqueta de certificación. *In 5º Congress International Science et Culture de la Truffe*, Aix-en-Provence, p. 6.311-6.313.
- Parladé, J., Pera, J. and Alvarez, I. F. (1996). Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 6: 237-245.
- Pereira, G., Palfner, G., Chavez, D., Suz, L.M., Machuca, A. and Honrubia, M. (2013). Using common mycorrhizal networks for controlled inoculation of *Quercus* spp. with *Tuber melanosporum*: the nurse plant method. *Mycorrhiza*. 23: 373-380.
- Peterson, R. L. and Bonfante, P. (1994). Comparative structure of vesicular arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. *Plant. Soil* 159: 79–88.
- Plattner, I. and Hall, I. R. (1995). Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycol. Res.* 99: 1367–1370.
- Pomarico, M., Figliuolo, G. and Rana, G. L. (2007). *Tuber* spp. biodiversity in one of the southernmost European distribution areas. *Biodivers. Conserv.* 16: 3447-3461.
- Pruett G.E. 2008. The biology and ecology of *Tuber aestivum* mycorrhizae establishment in the greenhouse and the field. Doctoral dissertation, University of Missouri-Columbia.
- Pruett, G. E., Bruhn, J. N. . Mihail, J. D. (2008b). Colonization of Pedunculate oak by the Burgundy truffle fungus is greater with natural than with pelletized lime. *Agroforest Syst.* 72: 41-50.
- Pruett, G., Bruhn, J. and Mihail, J. (2008a). Temporal Dynamics of ectomycorrhizal community composition on root systems of oak seedlings infected with Burgundy truffle. *Mycological research* 112: 1344-1354.

- Rubini, A., Belfiori, B., Riccioni, C. and Paolocci, F. (2012). Genomics of *Tuber melanosporum*: new knowledge concerning reproductive biology, symbiosis and aroma production, p. 57-72. In Zambonelli, A. and Bonito, G. M. (eds), Edible ectomycorrhizal mushrooms. Soil biology, vol 34. Springer, Berlin.
- Salerni, E., D'Aguanno, M., Leonardi, P. and Perini, C. (2014). Ectomycorrhizal communities above and below ground and truffle productivity in a *Tuber aestivum* orchard. Forest Systems 23(2): 329-338.
- Shamekh, S., Grebenc, T., Leisola, M. and Turunen, O. (2014). The cultivation of oak seedlings inoculated with *Tuber aestivum* Vittad. in boreal region of Finland. Mycol. Progress. 13: 373-380.
- Smith, S.E. and Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd ed., p. 208-385. Elsevier Academic Press.
- Song, M. S., Cao, J. Z. and Yao, Y. J., (2005). Occurrence of *Tuber aestivum* in China. Mycotaxon 91: 75-80.
- Stobbe, U., Büntgen, U., Sproll, L., Tegel, W., Egli, S. and Fink, S. (2012). Spatial distribution and ecological variation of re-discovered German truffle habitats. Fungal. Ecol. 5:591–599.
- Stobbe, U., Egli, S., Tegel, W., Peter, M., Sproll, L. and Büntgen, U. (2013). Potential and limitations of Burgundy truffle cultivation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 5215-5224.
- Streiblová, E., Gryndlerová, H. and Gryndler, M. (2012). Truffle brûlé: an efficient fungal life strategy. FEMS Microbiol. Ecol. 80: 1-8.
- Streiblová, E., Gryndlerová, H., Valda, S. and Gryndler, M. (2010). *Tuber aestivum* – hypogeous fungus neglected in the Czech Republic. A review. Czech Mycol. 61(2): 163-173.
- Zambonelli, A., Iotti, M. and Piattoni, F. (2012). Chinese *Tuber aestivum sensulato* in Europe. Open Mycol. J. 6: 22-26.
- Zambonelli, A., Iotti, M., Zinoni, F., Dallavalle, E. and Hall, I.R. (2005). Effect of mulching on *Tuber uncinatum* ectomycorrhizas in an experimental truffiere. New Zeal. J. Crop Hort., 33(1): 65-73.

- Zambonelli, A., Piattoni, F., Iotti, M. and Hall, I. R. (2010). What makes a good truffle infested tree? In Greilhuber, I., Hausknecht, A. and Urban, A. (eds.). Proceedings of the first conference on the „European“ truffle *Tuber aestivum/uncinatum*. Österr Z Pilzk. 19:201-207.
- Thomas, P.W. (2012). The role of pH in *Tuber aestivum* syn. *uncinatum* mycorrhiza development within commercial orchards. Acta. Mycol. 47(2): 161-167.
- Trappe, J. M. and Claridge, A. W. (2010). The Hidden Life of Truffles. Sci. Am. 4: 78-84.
- Turgeman, T., Sitrit, Y., Danai, O., Luzzati, Y., Bustan, A., Roth-Bejerano, N., Kagan-Zur, V. and Masaphy, S. (2012). Introduced *Tuber aestivum* replacing introduced *Tuber melanosporum*: a case study. Agroforest Syst. 84:337-343.
- Wallander, H. (1992). Regulation of ectomycorrhizal symbiosis in *Pinus sylvestris* L. seedlings – influence of mineral nutrition. Doctoral thesis at the Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Wang, Y. And Hall, I.R. (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. Can. J. Bot. 82: 1063-1073.
- Wang, Y. J., Tan, Z. M., Zhang, D. C., Murat, C., Jeandroz, S. and Le Tacon, F. (2006). Phylogenetic and populational study of the *Tuber indicum* complex. Mycol. Res. 110: 1034–1045.
- Wang, Y., Hall, I. R. and Evans, L. A. (1997). Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 1. *Tricholoma matsutake* and related fungi. Econ. Bot. 51: 311- 327.
- Weden, C. (2004). Black truffle of Sweden. Systematics, population studies, ecology and cultivation of *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum*. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the faculty of science and technology 1043.
- Weden, C., Chevalier, G. and Danell, E. (2004a). *T. aestivum* (syn. *T. uncinatum*) biotopes and their history on Gotland, Sweden. Mycol. Res. 108(3):304–310.
- Weden, C., Danell, E. and Tibell, L. (2005). Species recognition in the truffle genus *Tuber* – the synonyms *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*. Environ. Microbiol. 7(10): 1535-1546.

Weden, C., Danell, E., Camacho, F.J. and Backlund, A. (2004b). The population of the hypogeous fungus *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum* on the island of Gotland. Mycorrhiza. 14: 19–23.

Weden, C., Pettersson, L. and Danell, E. (2009). Truffle cultivation in Sweden: Results from *Quercus robur* and *Corylus avellana* field trials on the island of Gotland. Scand. J. Forest Res. 24: 37-53.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p 315-322. *In*: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds) PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, USA.

Kasutatud veebiaadressid

1. <http://m.postimees.ee/section/380/3336603> [26.05.2016]
2. http://chem.aalto.fi/en/current/current_archive/news/2012-10-24/ [26.05.2016]
3. <http://www.truffletree.com/plantation/> [26.05.2016]
4. <http://www.deemy.de/taxa/ItemDescription.cfm?ItemID=288> [26.05.2016]

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadri Onemar (sünnikuupäev 20.04.1992),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Tamme istikute inokuleerimine suvitrühvli (*Tuber aestivum*) eostega“, mille juhendajad on Leho Tedersoo ja Eveli Otsing,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016